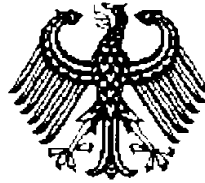


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 64 805.3

**Anmeldetag:** 22. Dezember 2000

**Anmelder/Inhaber:** Aventis CropScience GmbH, Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren

**IPC:** C 12 N, A 01 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. November 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Müller'.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'König'.

## Beschreibung

- 5 Monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren

10 Die vorliegende Erfindung betrifft monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht, das ein Protein mit der biologischen Aktivität eines R1-Proteins codiert. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und  
● Verfahren zu deren Herstellung. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie  
15 einen im Vergleich zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten monokotyledonen Pflanzen erhöhten Phosphatgehalt und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder eine erhöhte Endviskosität im RVA-Profil und/oder eine verringerte Peaktemperatur in der DSC-Analyse und/oder eine erhöhte Gelfestigkeit im Texture Analyser aufweist. Die vorliegende Erfindung betrifft  
20 daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

● Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der  
25 Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

30 Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten

5 unterscheiden. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet zwei chemisch unterschiedliche Komponenten der Stärke: die Amylose und das Amylopektin. In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z.B. Mais, Weizen oder Kartoffel, besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 20% - 30% aus Amylose-Stärke und zu ca. 70% - 80% aus Amylopektin-Stärke.

10 Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften  $\alpha$ -D-Glucose Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von ca. 0,1%  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92). Grundsätzlich gilt jedoch, daß die

15 vollständige Trennung der Amylose vom Amylopektin sehr schwierig ist, so daß die Qualität der Amylose stark abhängt von der Art der gewählten Trennungsmethode. Im Gegensatz zur Amylose ist das Amylopektin stärker verzweigt und weist ca. 4% Verzweigungspunkte auf, die durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande kommen. Das Amylopektin stellt ein

20 komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten dar. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen beiden Molekülen liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein

Molekulargewicht von  $5 \times 10^5 - 10^6$  Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und  
25 ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt in den relativen Mengen an Spurenstoffen, die mit diesen Makromolekülen assoziiert  
30 vorliegen können. Amylose besitzt eine hohe Affinität zu hydrophoben Molekülen. Insbesondere in Getreiden kann die Amylose mit relativ hohen Mengen an Lipiden komplexiert sein (Morrison, Cereal Foods World 40, (1995), 437-446). Amylopektin kann andererseits kovalent gebundenes anorganisches Phosphat in Form von

Stärkephosphatmonoestern enthalten, was für die Amylose bisher nicht beschrieben wurde. Hohe Gehalte an Phosphatmonoestern werden speziell in Stärken gefunden, die aus Knollenfrüchten gewonnen sind. Unter den kommerziell erhältlichen Stärken hat die Kartoffelstärke den höchsten Phosphatgehalt, der zwischen 10-30 nmol mg<sup>-1</sup> Stärke liegen kann. In Curcuma-Arten kann der Phosphatgehalt sogar 2-4 fach höher liegen (Bay-Smidt et al., 5th ISPMP Meeting Proceedings, (1997), 741), während er in Getreiden ca. 100-fach geringer ist (Kasemsuwan und Jane, Cereal Chem. 73, (1996), 702-707). Das in Getreidestärken (monokotyledone Pflanzen) nachweisbare Phosphat liegt im Gegensatz zu den Stärken aus Knollenfrüchten, Wurzeln und Hülsenfrüchten kaum in Form von Stärkemonoester-Derivaten, sondern hauptsächlich in Form von Phospholipiden vor (Jane et al., Cereal Foods World 41, (1996), 827-832).

Die funktionellen Eigenschaften der Stärke werden neben dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis und dem Phosphatgehalt stark beeinflusst durch das Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt etc.. Als wichtige funktionelle Eigenschaften sind hierbei beispielsweise zu nennen die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit etc.. Auch die Stärkekorngröße kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein.

Der Phosphatgehalt läßt sich grundsätzlich sowohl durch gentechnische Ansätze als auch durch nachträgliche chemische Phosphorylierung nativer Stärken (s. beispielsweise in: Starch Chemistry and Technology. Eds. R. L. Whistler, J. N. BeMiller and E. F. Paschall. Academic Press, New York, 1988, 349-364) modifizieren. Chemische Modifikationen sind jedoch in der Regel kosten- und zeitintensiv und führen zu Stärken, die sich in ihren physico-chemischen Eigenschaften von in vivo modifizierten Stärken unterscheiden können. Da Stärken von monokotyledonen Wildtyp-Pflanzen, insbesondere von Getreidepflanzen (Weizen, Reis, Mais, Hafer, Hirse, Roggen), nur einen sehr geringen Gehalt an Phosphat in Form von Stärkephosphatmonoestern aufweisen (Lim et al. Cereal Chem. 71, (1994), 488), ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, monokotyledone Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die Stärken mit im

Vergleich zu entsprechenden Wildtyppflanzenzellen und -pflanzen erhöhtem Phosphatgehalt (Gehalt an Stärkephosphatmonoestern) und veränderten physico-chemischen Eigenschaften synthetisieren.

- 5     Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, genetisch veränderte monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen zur Verfügung zu stellen, welche im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen und -Pflanzen Stärken mit veränderten strukturellen und/oder funktionellen Eigenschaften synthetisieren, sowie Stärke zur Verfügung zu stellen, welche sich in
- 10    ihren strukturellen und/oder funktionellen Eigenschaften von Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen und -Pflanzen und von chemisch modifizierter Stärke unterscheidet und somit für allgemeine und/oder spezielle industrielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.
- 15    Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst, denn es wurde überraschenderweise gefunden, daß die Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom von monokotyledonen Pflanzenzellen und Pflanzen zu einer Veränderung der strukturellen und/oder funktionellen Eigenschaften der in diesen monokotyledonen
- 20    Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierten Stärke führt.

Die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls ist vor allem in stärke-speichernden Organen von monokotyledonen Pflanzen von Vorteil, insbesondere von Weizenpflanzen, und führt zu einer Erhöhung des

25    Phosphatgehaltes und einer Veränderung der Viskositätseigenschaften der aus den stärke-speichernden Organen isolierbaren Stärken im Vergleich zu Stärken, die man aus stärke-speichernden Organen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyppflanzen, insbesondere von Weizenpflanzen, isolieren kann. Ferner unterscheiden sich die erfindungsgemäßen Stärken von chemisch phosphorylierten

30    Stärken durch ein verändertes Phosphorylierungsmuster, veränderte Viskositätseigenschaften und nach Verkleisterung der Stärken und Gelbildung auch durch veränderte Gelfestigkeiten.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung monokotyledone genetisch modifizierte Pflanzenzellen, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht und das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- 5 a) Nucleinsäuremolekülen, die die codierende Region der unter Seq ID No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz umfassen;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* mit der unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Derivat der unter Seq ID No. 1 angegebenen
- 10 Nucleotidsequenz darstellen; und
- d) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

Der Begriff "genetisch modifiziert" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung,

15 daß die Pflanzenzelle durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in ihrer genetischen Information verändert ist und daß das Vorhandensein oder die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls zu einer phänotypischen Veränderung führt. Der Begriff „phänotypische Veränderung“ bedeutet dabei vorzugsweise eine meßbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der

20 Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzenzellen ein verändertes Expressionsmuster. Der Begriff "genetisch modifiziert" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung ferner, daß die erfindungsgemäße monokotyledone Pflanzenzelle mindestens ein fremdes

25 Nucleinsäuremolekül stabil in dem Genom integriert enthält.

Unter dem Begriff "fremdes Nucleinsäuremolekül" wird im Sinne der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül verstanden, das ein Protein mit der biologischen Aktivität eines R1-Proteins codiert, vorzugsweise eines aus *Solanum tuberosum*, und das natürlicherweise in entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-

30 Pflanzenzellen nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nucleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, dessen Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt. Die erfindungsgemäßen monokotyledonen Pflanzenzellen enthalten mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül, wobei dieses vorzugsweise

mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor.

Ein fremdes Nucleinsäuremolekül, das für ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* codiert, ist beispielsweise unter SEQ ID No.1 dargestellt. Für ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* codierende Nucleotidsequenzen wurden auch in der WO 97/11188 A1 sowie in Lorberth et al. (Nature Biotech. 16, (1998), 473-477) beschrieben.

- 10 Wichtige Charakteristika von R1 Proteinen aus *Solanum tuberosum* sind i) ihre Aminosäuresequenz (s. beispielsweise SEQ ID No. 2); ii) ihre Lokalisation im Stroma der Plastiden pflanzlicher Zellen, wobei sie dort sowohl in stärkekorngelagerter als auch in löslicher Form vorliegen können ; iii) ihre Fähigkeit zur Beeinflussung des Grades der Phosphorylierung der Stärke in Pflanzen. Beispielsweise führt die
- 15 Inhibierung des R1 Gens codierend für ein R1-Protein aus Kartoffel in transgenen Kartoffelpflanzen zu einer Verringerung des Phosphatgehaltes der aus den Kartoffelknollen isolierbaren Stärke. Darüberhinaus konnten Lorberth et al. zeigen, daß das R1-Protein aus *Solanum tuberosum* in der Lage ist, bakterielles Glykogen zu phosphorylieren, wenn man die korrespondierende R1 cDNA in *E. coli* exprimiert
- 20 (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477). Ritte et al. (Plant J. 21, (2000), 387-391) konnten zeigen, daß das R1-Protein aus *Solanum tuberosum* in Kartoffelpflanzen reversibel an Stärkekörner bindet, wobei die Stärke der Bindung an das Stärkekorn abhängt vom metabolischen Status der
- 25 Pflanze. In stärkekorngelagerter Form liegt das Protein in Kartoffelpflanzen vornehmlich bei Blättern vor, die im Dunklen gehalten wurden. Nach Beleuchtung der Blätter liegt das Protein dagegen hauptsächlich in der löslichen, nicht an das Stärkekorn gebundenen Form vor.
- Ferner führt die Inhibierung der Expression des R1-Gens aus Kartoffel in transgenen Kartoffelpflanzen zu einem "starch-excess"-Phänotyp, d.h. die Blätter
- 30 entsprechender Pflanzen weisen einen erhöhten Gehalt an Stärke auf (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477). Darüberhinaus zeichnen sich die Knollen solcher Kartoffelpflanzen dadurch aus, daß sie nach Kaltlagerung ein verringertes „cold-induced-sweetening“ aufweisen (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477).

Das fremde Nucleinsäuremolekül, das für ein R1-Protein codiert, kann prinzipiell aus jeder Kartoffelsorte oder Kartoffelpflanze stammen, vorzugsweise aus Kartoffelsorten der Varietäten Tomensa, Desiree, Tempora und Thomana.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform weist das fremde Nucleinsäuremolekül die unter SEQ ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz auf.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfaßt das fremde Nucleinsäuremolekül die codierende Region der unter SEQ ID No.1 dargestellten  
10 Nucleotidsequenz.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* mit der unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz.

15

In noch einer weiteren Ausführungsform der Erfindung weisen die fremden Nucleinsäuremoleküle die codierende Region des reifen (Protein ohne plastidäres Signalpeptid) Proteins (bp 447-bp 4607 der unter der SEQ ID No. 1 angegebenen Nucleotidsequenz) auf. Anstelle des plastidären N-terminalen Signalpeptids des R1-Proteins aus Kartoffel (Aminosäuren 1 bis 77 codiert durch die Nucleotide 216 bis  
20 446 der unter SEQ ID No.1 angegebenen Nucleotidsequenz) weisen die fremden Nucleinsäuremoleküle in dieser Ausführungsform der Erfindung eine heterologe plastidäre Signalsequenz auf, d.h. eine Signalsequenz, die natürlicherweise nicht in Verbindung mit dem reifen R1-Protein vorliegt. Plastidäre Signalsequenzen sind dem  
25 Fachmann bekannt.

Als plastidäre Signalsequenz kann beispielsweise die Signalsequenz der Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (FNR) aus Spinat verwendet werden. Die Sequenz enthält den 5'-nichttranslatierten Bereich sowie die flankierende Transitpeptidsequenz der cDNA des plastidären Proteins Ferredoxin:NADP<sup>+</sup>  
30 oxidoreductase aus Spinat (Nukleotid -171 bis + 165; Jansen et al., Current Genetics 13, (1988), 517-522).

Ferner kann als Signalsequenz beispielsweise das Transitpeptid des waxy-Proteins aus Mais plus die ersten 34 Aminosäuren des reifen waxy-Proteins (Klösigen et al., Mol. Gen. Genet. 217, (1989), 155-161) verwendet werden. Darüberhinaus kann das



Transitpeptid des waxy-Proteins aus Mais verwendet werden ohne die ersten 34 Aminosäuren des reifen waxy-Proteins.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt das fremde  
 5 Nucleinsäuremolekül ein Derivat der unter SEQ ID No.1 angegebenen Nukleotidsequenz dar.

Der Ausdruck „Derivat“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von der unter SEQ Id No. 1 angegebenen  
 10 Nucleotidsequenz an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zur codierenden Region der unter der SEQ ID No. 1 angegebenen Nucleotidsequenz aufweisen. Zusätzlich zeichnen sich Derivate  
 dadurch aus, daß sie für ein Protein mit der biologischen Aktivität eines R1-Proteins, vorzugsweise eines R1-Proteins aus *Solanum tuberosum*, codieren.  
 15 „Homologie“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Sequenzidentität von Nucleotidsequenzen von mindestens 65 %, insbesondere von mindestens 85 %, insbesondere eine Identität von mindestens 90 %, vorzugsweise über 95 % und besonders bevorzugt über 98 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Addition, Substitution,  
 20 Insertion oder Rekombination entstanden sein.  
 Vorzugsweise wird der Grad der Homologie bestimmt durch Sequenzvergleich der betreffenden Nucleotidsequenz mit der codierenden Region von SEQ ID No.1, insbesondere mit der für das reife Protein codierenden Region von SEQ ID No.1  
 (bp447-bp4607) der SEQ ID No. 1 angegebenen Nucleotidsequenz). Weisen die zu  
 25 vergleichenden Sequenzen unterschiedliche Längen auf, so bezieht sich der Grad der Homologie vorzugsweise auf den Prozentsatz an Nukleotiden in der kürzeren Nukleotidsequenz, die identisch zu den Nukleotiden der längeren Sequenz sind, d.h. die Sequenzidentität wird für den Bereich bestimmt, in dem sich die betreffenden Nucleotidsequenzen überlappen. Die Sequenzvergleiche können durchgeführt  
 30 werden unter Verwendung bekannter Computerprogramme, wie z.B. dem Programm ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22, (1994), 4673-4680), das durch Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE; European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Deutschland) vertrieben wird. Clustal W

kann auch von verschiedenen Internetseiten heruntergeladen werden, wie z.B. der des IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) und der des EBI (European Bioinformatics Institute) (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) sowie von

5 verschiedenen Internet-Seiten mit Verknüpfungen zum EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK).

Bei Verwendung des ClustalW Programs (Version 1.8) werden für die verschiedenen Parameter die voreingestellten Werte (default values) verwendet. Im Falle von DNA-Sequenzvergleichen besitzen diese Parameter folgende Werte: KTUPLE=2,

10 TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

Im Falle von Proteinsequenzvergleichen werden ebenfalls die voreingestellten Werte (default values) für die Parameter des ClustalW Programms verwendet. Diese

Parameter besitzen die folgenden Werte: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5,

15 PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Der Grad der Homologie kann beispielsweise ermittelt werden unter Verwendung bekannter Computerprogramme, wie z.B. Mview

(<http://www.sacs.ucsf.edu/documentation/seqsoftware/mview>; Brown, N.P., Leroy

20 C., Sander C. (1998). MView: A Web compatible database search or multiple alignment viewer. *Bioinformatics*,14(4):380-381).

„Homologie“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen

25 oder den durch sie codierten Proteinen besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den unter SEQ ID No.1 beschriebenen Nucleinsäuremolekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben, die also in vivo in der Lage sind, den Phosphatgehalt von Stärken in monokotyledonen

30 Pflanzen zu erhöhen. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Kartoffelsorten, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Derivat der SEQ ID No.1 um allelische Varianten des unter SEQ ID No.1 angegebenen Nucleinsäuremoleküls.

Bei den allelischen Varianten handelt es sich um natürlich auftretende Varianten, die in der Lage sind, den Phosphatgehalt von Stärken zu erhöhen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung stellt das fremde Nucleinsäuremolekül ein Fragment der erfindungsgemäß definierten fremden Nucleinsäuremoleküle dar.

10

Der Begriff „Fragment“ bezeichnet im Sinne der vorliegenden Erfindung Teile des fremden Nucleinsäuremoleküls, die für einen biologisch aktiven, vorzugsweise enzymatisch aktiven, Teil des R1 Proteins codieren.

Ein biologisch aktiver Teil eines R1-Proteins zeichnet sich dadurch aus, daß er *in planta* bei Über-Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls eine Erhöhung des Phosphatgehaltes bewirken kann und/oder daß er nach Expression in *E. coli* die Phosphorylierung von Glykogen vermittelt (s. WO 97/11188 A1, Beispiel 9).

Die von den verschiedenen Varianten (Fragmente, Derivate, allelische Varianten) der fremden Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. gehören die biologische Aktivität, die enzymatische Aktivität, eine ähnliche Primärstruktur, die mit Hilfe der oben beschriebenen Homologievergleiche der Proteine untersucht werden kann.

Vorzugsweise weisen die Aminosäuresequenzen der Proteine zueinander eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt von mindestens 85%, insbesondere von mindestens 95% und besonders bevorzugt von mindestens 97% auf.

Neben den oben beschriebenen Charakteristika können die fremden Nucleinsäuremoleküle dadurch gekennzeichnet sein, daß sie für Proteine mit der biologischen Aktivität von R1-Proteinen codieren, die mindestens eines, bevorzugt mindestens fünf, insbesondere mindestens 10 und besonders bevorzugt alle der folgenden charakteristischen Peptidmotive aufweisen:

DKAAET (SEQ ID No. 3), IADME (SEQ ID No. 4), VWMRFM (SEQ ID No. 5), MQEWHQ (SEQ ID No. 6), LGHYM (SEQ ID No. 7), ERGYEE (SEQ ID No.8),

KAVLDR (SEQ ID No. 9), LSSLL (SEQ ID No. 10), IPDGAV (SEQ ID No. 11), KVCFAT (SEQ ID No. 12), ISADEF (SEQ ID No. 13), PFGVFE (SEQ ID No. 14), SSGDD (SEQ ID No. 15), SFICKK (SEQ ID No. 16).

- 5 Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein fremdes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt, d.h. in einer anderen
- 10 genomischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße transgene Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihrem Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls.
- 15 Handelt es sich bei den in die Zellen eingeführten Nucleinsäuremolekülen um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen insbesondere dadurch unterscheiden, daß diese zusätzlichen Kopien an Orten im Genom lokalisiert sind,
- 20 an denen sie natürlicherweise nicht vorkommen. Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.
- Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden
- 25 Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, so weisen die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle auf, und zwar auch in solchen Organen, in denen bei Wildtyppflanzen keine Transkripte nachzuweisen sind. Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen enthalten vorzugsweise Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Diese lassen sich z. B. durch
- 30 Northern-Blot-Analyse nachweisen. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen ein Protein, das durch ein eingeführtes fremdes Nucleinsäuremolekül codiert wird. Dies zusätzliche Protein kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen eine erhöhte biologische Aktivität von R1-Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen und Wildtyp-Pflanzen auf.

5 Eine „erhöhte biologische Aktivität von R1-Protein“ kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung beispielsweise bestimmt werden durch Messung des Phosphatgehaltes der Stärken, die in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisiert werden. Im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen zeichnen sich die Stärken der  
10 erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, die eine erhöhte biologische Aktivität an R1-Protein aufweisen, dadurch aus, daß sie eine Stärke mit erhöhtem Phosphatgehalt, vorzugsweise einem erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der  
Glukosemonomere, synthetisieren.

Ferner kann eine erhöhte biologische Aktivität von R1-Protein bestimmt werden  
15 durch Messung der Menge an R1-Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse, im Vergleich zur Menge an R1-Transkripten von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen.

Ferner kann eine erhöhte biologische Aktivität von R1-Protein bestimmt werden durch Messung der Menge an R1-Protein, z.B. durch Western-Blot-Analyse, im  
20 Vergleich zur Menge an R1-Protein von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen.

Es wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen monokotyledonen Pflanzenzellen  
eine Stärke mit erhöhtem Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere  
25 und/oder verändertem Phosphorylierungsmuster und/oder veränderten Viskositätseigenschaften synthetisieren im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Vorzugsweise betrifft die vorliegende Erfindung daher erfindungsgemäße  
30 Pflanzenzellen, die eine Stärke synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder veränderte Viskositätseigenschaften aufweist im

Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „Phosphatgehalt“ der Stärke bezeichnet im Sinne der vorliegenden

- 5 Erfindung den Gehalt an kovalent in Form von Stärkephosphatmonoestern gebundenem Phosphat.

Unter dem Begriff „C6-Position“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung die Phosphatgruppen, die an Kohlenstoffatomposition „6“ der Glukosemonomere der

- 10 Stärke gebunden sind.

Unter einem "erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position" versteht man im

Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, daß mittels eines optisch-enzymatischen Tests (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 111-117, s.

- 15 Methoden) in C6-Position der Glukosemonomere Phosphatgruppen nachweisbar sind, vorzugsweise versteht man unter einem "erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position" eine Erhöhung des Phosphatgehaltes der Stärke in C6-Position des Glukosemonomers um mindestens 20%, bevorzugt um mindestens 50% und besonders bevorzugt um mindestens 100% im Vergleich zum Phosphatgehalt von

- 20 Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

Grundsätzlich können in der Stärke in vivo die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann die Bestimmung des Phosphatgehaltes in C6-Position (= C6-P-

- 25 Gehalt) über eine Glukose-6-phosphat-Bestimmung mittels eines optisch-enzymatischen Tests (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 111-117) erfolgen (siehe Methoden).

Der Begriff „verändertes Phosphorylierungsmuster“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß der Gesamtposphatgehalt der kovalent an die Stärke

- 30 gebundenen Phosphatgruppen innerhalb der verschiedenen Schichten des Stärkekorns im Vergleich zu chemisch phosphorylierten Stärken, die aus Stärken von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen hergestellt wurden, verändert ist. Chemisch phosphorylierte Stärken zeichnen sich durch einen Phosphat-Gradienten innerhalb des Stärkekorns aus, wobei die äußeren Schichten

des Stärkekorns in der Regel stärker phosphoryliert sind als die inneren Schichten. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die erfindungsgemäßen Stärken dadurch, daß sich die Phosphatgruppen anders über die verschiedenen Schichten des Stärkekorns verteilen, d.h. die erfindungsgemäßen Stärken können dadurch gekennzeichnet sein, daß sie den für chemisch phosphorylierte Stärken typischen Gradienten von außen nach innen nicht aufweisen.

Methoden zur Untersuchung des Phosphorylierungsmusters der Stärke sind dem Fachmann bekannt (s. beispielsweise Jane und Shen, Carbohydrate Research 247, (1993), 279-290; Gough and Pybus, Staerke 25, (1973), 123-130). Diese Methoden basieren auf einer stufenweisen chemischen Verkleisterung der verschiedenen Schichten des Stärkekorns, bei der die verkleisterten Schichten des Stärkekorns schrittweise mechanisch entfernt werden. Nach dieser Schälung erfolgt die Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes der verschiedenen Stärkekornschichten mittels Standardmethoden.

Unter dem Begriff „chemisch phosphorylierte Stärke“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, die durch chemische Phosphorylierung nativer Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen und/oder Pflanzen hergestellt wurde. Vorzugsweise wird bei der chemischen Phosphorylierung nativer Stärken der Phosphatgehalt in C6-Position durch die Wahl geeigneter Versuchsbedingungen so eingestellt, daß der Phosphatgehalt in C6-Position der chemisch phosphorylierten Stärke dem Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere der erfindungsgemäßen Stärken gleicht und/oder vergleichbar ist.

Unter dem Begriff "veränderte Viskositätseigenschaften" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung insbesondere eine Erhöhung der Endviskosität im RVA-Profil und/oder eine Verringerung der Peaktemperatur in der DSC-Analyse.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke, die im Vergleich zu Stärke aus

entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen eine erhöhte Endviskosität aufweist.

Unter dem Begriff der „Endviskosität“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Viskosität, die sich aus einem Viskositätsprofil ermitteln läßt (s. Figur 1) und dort als "Final viscosity = Fin" bezeichnet ist. Das Viskositätsprofil kann mittels eines Rapid Visco Analysers (RVA) (Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood, NSW 2102, Australien) gewonnen werden. Die Erstellung des Viskositätsprofils erfolgt bei der Analyse von Weizenstärken nach dem folgenden Protokoll: 2.5 g Stärke (Trockensubstanz) werden in 25 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und für die Analyse in einem Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) verwendet. Der Betrieb des Gerätes erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Das vollständige Temperaturprogramm ist in Figur 1 in schematischer Weise dargestellt. Die Durchführungs der RVA-Analyse wird weiter unten (s. Methoden) beschrieben.

Der Begriff "erhöhte Endviskosität" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß die Endviskosität im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 30%, insbesondere um mindestens 50% und besonders bevorzugt um mindestens 80% erhöht ist, wobei die Endviskosität im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen um höchstens 500%, insbesondere um höchstens 250% erhöht sein kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen und/oder im Vergleich zu chemisch phosphorylierten Stärken gleichen oder vergleichbaren Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere eine verringerte Peaktemperatur aufweist.

Unter dem Begriff der „Peaktemperatur“ soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Temperatur T<sub>p</sub> verstanden werden, die sich mittels der Methode der Differential



Scanning Calorimetry (DSC), die dem Fachmann bekannt ist, bestimmen läßt. Die Peaktemperatur ist die Temperatur, die in der Regel dem ersten Peakmaximum der DSC-Kurve zugeordnet werden kann. Sie kann beispielsweise mit einem Gerät der Firma Perkin Elmer (Gerätbezeichnung: DSC-7) unter Verwendung von  
 5 Großraumkapseln durchgeführt werden, wobei die zu untersuchende Probe ein Verhältnis von Stärke zu Gesamtwassergehalt von ca. 1:4 aufweist und die Messung in einem Temperaturbereich von 10°C bis 160°C durchgeführt wird bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 10°C/min (vgl. Beispiel 4).

- 10 Der Begriff "verringerte Peaktemperatur"  $T_p$  bedeutet dabei, daß die Peaktemperatur  $T_p$  im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen um mindestens 1.5°C, bevorzugt um mindestens 2.5°C, insbesondere um mindestens 4°C und besonders bevorzugt um mindestens 6°C verringert ist, maximal um höchstens 15°C, um höchstens 12°C oder um höchstens  
 15 9°C.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen, die eine Stärke synthetisieren, die nach Verkleisterung ein Gel bildet, das im Vergleich zu einem Gel aus Stärke von  
 20 entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweist.

Unter dem Begriff „erhöhte Gelfestigkeit“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Gelfestigkeit um mindestens 20%, insbesondere um  
 25 mindestens 50%, bevorzugt um mindestens 80% und besonders bevorzugt um mindestens 100%, maximal um höchstens 500% oder um höchstens 250% im Vergleich zur Gelfestigkeit von Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

Die Bestimmung der Gelfestigkeit kann im Zusammenhang mit der vorliegenden  
 30 Erfindung mit Hilfe eines Texture Analyzers unter den unten beschriebenen Bedingungen erfolgen (s. Methoden).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann sich die Erhöhung des Phosphatgehaltes der Stärken auf die Amylopektinkomponente der Stärke beziehen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen, die eine Stärke synthetisieren, deren Amylopektinkomponente phosphoryliert ist und deren Amylosekomponente im Vergleich zur Amylosekomponente von entsprechenden chemisch phosphorylierten Stärken gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere einen verringerten Gesamtposphatgehalt aufweist.

D. h., im Gegensatz zu chemisch phosphorylierten Stärken gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere können sich die Stärken der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dadurch auszeichnen, daß die

Amylosekomponente der Stärke der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen im Vergleich zur Amylosekomponente chemisch phosphorylierter Stärke gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere, die aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen hergestellt wurde, einen verringerten Gesamtposphatgehalt aufweist.

Unter dem Begriff des „Gesamtposphatgehalt“ der Stärke versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung den Gehalt an kovalent in Form von Stärkephosphatmonoestern gebundenem Phosphat in C2-, C3- und C6-Position der Glukoseeinheiten. Der Gehalt an phosphorylierten Nicht-Glukanen, wie z.B. Phospholipiden, ist erfindungsgemäß von dem Begriff „Gesamtposphatgehalt“ nicht umfaßt. Phosphorylierte Nicht-Glukane müssen daher vor Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes quantitativ abgetrennt werden.

Verfahren zur Trennung der phosphorylierten Nicht-Glukane (z.B. Phospholipide) von der Stärke sind dem Fachmann bekannt.

Unter dem Begriff „verringertes Gesamtposphatgehalt“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Verringerung des Gesamtposphatgehaltes verstanden werden um mindestens 5%, insbesondere um mindestens 20%, bevorzugt um mindestens 50% und besonders bevorzugt um mindestens 80% im Vergleich zum Gesamtposphatgehalt der Amylosekomponente einer chemisch phosphorylierten Stärke gleichen C6-Phosphatgehaltes, die aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen hergestellt wurde.

Methoden zur Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes sind dem Fachmann bekannt und sind unten beschrieben (s. Methoden).

Unter dem Begriff der „Amylopektinkomponente“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung das Amylopektin der Stärke verstanden werden.

Unter dem Begriff der „Amylosekomponente“ soll im Sinne der vorliegenden

5 Erfindung die Amylose der Stärke verstanden werden.

Verfahren zur Trennung von Amylose und Amylopektin sind dem Fachmann bekannt.

10 Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen stammen aus monokotyledonen Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung  
 oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung somit Pflanzenzellen aus stärke-synthetisierende bzw. stärke-speichernde  
 15 Pflanzen, wie z.B. aus Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Reis, Mais.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stammen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen aus einer Pflanze der Gruppe bestehend aus Weizen, Reis, Gerste, Hafer, Roggen und Mais. Bevorzugt sind Pflanzenzellen aus  
 20 Weizen-, Reis- und Maispflanzen, besonders bevorzugt aus Weizenpflanzen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens  $0.1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$   
 25 Stärke, insbesondere von mindestens  $0.5 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$ , bevorzugt von mindestens  $1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, besonders bevorzugt von mindestens  $2 \text{ C6-P nmol mg}^{-1}$  Stärke, insbesondere von mindestens  $5 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, ganz besonders bevorzugt von mindestens  $10 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, wobei die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der  
 30 Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens  $100 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke aufweist, insbesondere von höchstens  $50 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke und von höchstens  $25 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens 15 C6-P nmol mg<sup>-1</sup> Stärke aufweist, wobei die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens 100 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke aufweist, insbesondere von höchstens 50 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke und von höchstens 25 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle, worin eine Zelle einer monokotyledonen Pflanze genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht.

Für den Transfer von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33.).

Die Transformation monokotyler Pflanzen erfolgt inzwischen routinemäßig mittels des biolistischen Ansatzes und mittels Agrobakterien (Komari et al., (1998), Advances in cereal gene transfer; Current Opinion in Plant Biotechnology 1, S. 161 ff.; Bilang et al. (1999), Transformation of Cereals, Genetic Engineering, 12, S. 113-148 Hrsg.: JK Setlow, Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York).

Agrobakterium-basierende Vektoren wurden beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May

et al., *Bio/Technology* 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, *Int. J. Plant Sci.* 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, *Transgenic Res.* 2, (1993), 252-265). Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, *Plant Physiol.* 104, (1994), 37-48; Vasil et al., *Bio/Technology* 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., *Plant Mol. Biol.* 24, (1994), 317-325; Spencer et al., *Theor. Appl. Genet.* 79, (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO 95/06128, EP 0513849, EO 0465875, EP 292435; Fromm et al., *Biotechnology* 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2, (1990), 603-618; Koziel et al., *Biotechnology* 11 (1993), 194-200; Moroc et al., *Theor. Appl. Genet.* 80, (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., *Nature* 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Becker et al., *Plant J.* 5 (2), (1994), 229-307; Nehra et al., *Plant J.* 5, (1994), 285-297).

Für Reis wurden unterschiedliche Transformationsmethoden beschrieben, wie z.B. die Agrobakterium-vermittelte Transformation (Hiei et al., *Plant J.* 6 (1994), 271-282; Hiei et al., *Plant Mol. Biol.* 35 (1997), 205-218; Park et al., *J. Plant Biol.* 38 (1995), 365-371), die Protoplasten-Transformation (Datta, In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 66-75; Datta et al., *Plant Mol. Biol.* 20 (1992), 619-629; Sadasivam et al., *Plant Cell Rep.* 13 (1994), 394-396), der biolistische Ansatz zur Pflanzentransformation (Li et al., *Plant Cell Rep.* 12 (1993), 250-255; Cao et al., *Plant Cell Rep.* 11 (1992), 586-591; Christou, *Plant Mol. Biol.* (1997), 197-203) sowie die Elektroporation (Xu et al., In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 201-208).

Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, enthaltend die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und/oder die durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden können. Bevorzugt handelt es sich um monokotyledone Nutzpflanzen, wie z.B. Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Reis, Mais. Bevorzugt sind Weizen, Reis und Mais, besonders bevorzugt ist Weizen.

Die erfindungsgemäßen Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die sich, wie im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen beschrieben, in ihrem Phosphatgehalt und/oder in ihrem Phosphorylierungsmuster und/oder in ihren Viskositätseigenschaften von Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen unterscheidet.

Die Erfindung betrifft daher auch erfindungsgemäße Pflanzen, die eine Stärke synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder veränderte Viskositätseigenschaften aufweist.

Hinsichtlich der Erhöhung des Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere der Stärke, der Veränderung des Phosphorylierungsmusters und der Veränderung der Viskositätseigenschaften der Stärke gelten die im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen gemachten Angaben.

Vorzugsweise betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzen, die eine Stärke synthetisieren, die nach Verkleisterung ein Gel bildet, das im Vergleich zu einem Gel aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweist.

Der Begriff "erhöhte Gelfestigkeit" wurde im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen definiert.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen, vorzugsweise Weizenpflanzen, eine Stärke, vorzugsweise Weizenstärke, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von von mindestens  $0.1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$

Stärke, insbesondere von mindestens  $0.5 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$ , bevorzugt von mindestens  $1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, besonders bevorzugt von mindestens  $2 \text{ C6-P nmol mg}^{-1}$  Stärke, insbesondere von mindestens  $5 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, ganz besonders bevorzugt von mindestens  $10 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, wobei die erfindungsgemäßen Pflanzen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens  $100 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke

aufweist, insbesondere von höchstens 50 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke oder von höchstens 25 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke.

■

5 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die die erfindungsgemäßen Pflanzen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens 15 C6-P nmol mg<sup>-1</sup> Stärke aufweist, wobei die erfindungsgemäßen Pflanzen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens 100 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke aufweist, insbesondere von höchstens 50 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke oder von  
10 höchstens 25 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke.

■

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen die erfindungsgemäße Stärke in den stärke-speichernden Organen der erfindungsgemäßen Pflanze.

15

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen in ihren stärke-speichernden Organen eine Stärke, die im Vergleich zu Stärke aus stärke-speichernden Organen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-  
20 Position der Glukosemonomere und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder veränderte Viskositätseigenschaften aufweist.

Unter "stärke-speichernden Organen" sollen in diesem Zusammenhang solche Organe verstanden werden, wie z.B. die Körner von Mais-, Reis- und  
25 Weizenpflanzen, die Speicherstärke einlagern im Gegensatz zu solchen Organen, wie z.B. Blättern, die Stärke nur transient synthetisieren.

Die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls ist vor allem in stärke-speichernden Organen von monokotyledonen Pflanzen von Vorteil,  
30 insbesondere von Weizenpflanzen, und führt zu einer Erhöhung des Phosphatgehaltes der aus den stärke-speichernden Organen isolierbaren Stärken im Vergleich zu Stärken, die man aus stärke-speichernden Organen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyppflanzen, insbesondere von Weizenpflanzen, isolieren kann.

Die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls in stärke-speichernden Organen von monokotyledonen Pflanzen läßt sich zum einen erreichen durch die Verwendung konstitutiver Promotoren, wie z.B. des Promotors der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus (s. beispielsweise US-A-5,352,605) und des Ubiquitin-Promotors aus Mais (s. beispielsweise US-A-5,614,399).

Vorzugsweise werden Promotoren verwendet, die spezifisch sind für stärke-speichernde Organe, wie z.B. endosperm-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14, (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4, (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383, (1996), 213-218), der Shrunk-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4, (1985), 1373-1380), der HMW-Promotor aus Weizen (Anderson, Theoretical and Applied Genetics 96, (1998), 568-576, Thomas, Plant Cell 2 (12), (1990), 1171-1180), der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor (Sengupta-Gopalan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 3320-3324, Bustos, Plant Cell 1 (9) (1989), 839-853) oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29, (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93) oder die karyopsenspezifischen Promotoren der GBSSI (granule bound starch synthase I) (DE10041861.9) und der SSII (soluble starch synthase II) aus Weizen (DE10032379.0).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform zeigen die erfindungsgemäßen Pflanzen in den stärke-speichernden Organen dieser Pflanzen eine R1-Genexpression.

Die R1-Genexpression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an R1-Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse, im Vergleich zur Menge an R1-Transkripten von Wildtyppflanzen.

Ferner kann die R1-Genexpression im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung durch Messung der Menge an R1-Protein, z.B. durch Western-Blot-Analyse, bestimmt werden. Vorzugsweise erfolgt die Bestimmung der Menge an R1-Protein mit Hilfe von Protein-Extrakten, die aus Pflanzenzellen des Endosperms isoliert wurden.



In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung zeigen die erfindungsgemäßen Pflanzen in den stärkespeichernden Organen dieser Pflanzen eine R1-Genexpression, die im Vergleich zur R1-Genexpression in stärkespeichernden Organen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen erhöht ist, vorzugsweise um mindestens 50%, besonders bevorzugt um mindestens 100%, insbesondere um mindestens 250% und besonders bevorzugt um mindestens 500%.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform zeigen die erfindungsgemäßen Pflanzen eine organspezifische Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls in den stärkespeichernden Organen der erfindungsgemäßen Pflanzen.

Unter dem Begriff „organspezifisch“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß der gewählte Promoter die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls in den stärkespeichernden Organen im Vergleich zu reifen Blättern begünstigt und eine signifikant, wie beispielsweise mindestens 2- bis 5-fach, bevorzugt 5- bis 10-fach, besonders bevorzugt 10- bis 100fach erhöhte Expression bewirkt.

In dieser Ausführungsform der Erfindung zeichnen sich die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch aus, daß sie aufgrund der organspezifischen Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls eine erhöhte R1-Genexpression in den stärkespeichernden Organen aufweisen im Vergleich zur Genexpression des endogenen R1-Gens in den stärkespeichernden Organen einer entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanze. In dieser Ausführungsform der

Erfindung ist eine Erhöhung der R1-Genexpression in den Blättern der erfindungsgemäßen Pflanzen nicht in gleichem Ausmaß wie in den stärkespeichernden Organen nachweisbar. Vorzugsweise bezieht sich die Erhöhung der R1-Genexpression alleine auf die stärkespeichernden Organe.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um Pflanzen aus der Gruppe bestehend aus Weizen, Reis, Gerste, Hirse, Hafer, Roggen und Mais. Bevorzugt sind Weizen-, Reis- und Maispflanzen, besonders bevorzugt Weizenpflanzen.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäß definierten Pflanze, worin

- (a) eine Zelle einer monokotyledonen Pflanze genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht;
- (b) aus der gemäß Schritt (a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und gegebenenfalls
- (c) aus der gemäß Schritt (b) erzeugten Pflanze weitere Pflanzen erzeugt werden.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäß definierten Pflanze, die in den stärkepeichernden Organen dieser Pflanze eine Stärke mit erhöhtem Phosphatgehalt und/oder einem veränderten Phosphorylierungsmuster und/oder einer erhöhten Endviskosität und/oder einer verringerten Peaktemperatur synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus stärkepeichernden Organen von Wildtyp-Pflanzen, worin

- (a) eine Zelle einer monokotyledonen Pflanze genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines erfindungsgemäß definierten fremden Nucleinsäuremoleküls besteht;
- (b) aus der gemäß Schritt (a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und gegebenenfalls
- (c) aus der gemäß Schritt (b) erzeugten Pflanze weitere Pflanzen erzeugt werden.

Für die laut Schritt (a) eingeführte genetische Modifikation gilt dasselbe, was bereits oben in Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen erläutert wurde.

Die Regeneration von Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) der erfindungsgemäßen Verfahren kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über Stecklinge, Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise

kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften miteinander gekreuzt und vermehrt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung zeichnen sich die  
5 erfindungsgemäße Verfahren dadurch aus, daß das gemäß Schritt (a) in die Pflanzenzelle eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- (i) Nucleinsäuremolekülen, die die codierende Region der unter Seq ID No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz umfassen;
- 10 (ii) Nucleinsäuremolekülen, die ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* mit der unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- (iii) Nucleinsäuremolekülen, die ein Derivat der unter Seq ID No. 1 angegebenen Nukleotidsequenz darstellen; und
- (iv) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente der unter (i), (ii) oder (iii) genannten  
15 Nucleinsäuremoleküle darstellen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform zeichnen sich die  
erfindungsgemäßen Verfahren dadurch aus, daß das fremde Nucleinsäuremolekül  
unter der Kontrolle eines Promotors steht, der organspezifisch die R1-  
20 Genexpression in stärke-speichernden Geweben vermittelt, vorzugsweise eines endospermspezifischen und/oder karyopsenspezifischen Promoters.

Derartige Promotoren, wie z.B. endospermspezifische und karyopsenspezifische,  
wurden oben im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzen in  
25 beispielhafter Weise aufgeführt.

In einer weiteren Ausführungsform betreffen die erfindungsgemäßen Verfahren  
monokotyledone Nutzpflanzen, wie z.B. Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Reis,  
Mais. Bevorzugt sind Weizen, Reis und Mais, besonders bevorzugt ist Weizen.

30

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch die erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen enthaltend erfindungsgemäße Pflanzenzellen sowie der gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Pflanzen. Der Begriff

„Vermehrungsmaterial“ umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung jene

- 5 Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder generativem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfaßt beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen etc.. Vorzugsweise handelt es sich bei dem
- 10 Vermehrungsmaterial um Samen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von erfindungsgemäß

- definierten fremden Nucleinsäuremolekülen zur Herstellung von erfindungsgemäßen Pflanzen, vorzugsweise von Weizen-, Mais- und Reispflanzen, besonders bevorzugt
- 15 von Weizenpflanzen, oder zur Herstellung von monokotyledonen erfindungsgemäßen Pflanzenzellen.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren, insbesondere in ihren stärkepeichernden Organen, eine Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Phosphatgehalt und/oder dem

20 Viskositätsverhalten und/oder dem Phosphorylierungsmuster im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke und im Vergleich zu chemisch phosphorylierten Stärken verändert ist.

- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, Pflanzen und/oder Vermehrungsmaterial erhältlich ist.

- In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die erfindungsgemäßen
- 30 Stärken dadurch gekennzeichnet, daß sie im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder eine erhöhte Endviskosität und/oder eine verringerte Peaktemperatur aufweist.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Stärke, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder

5 eine erhöhte Endviskosität und/oder eine verringerte Peaktemperatur aufweist.

Hinsichtlich der Erhöhung des Phosphatgehaltes in C6-Position, der Veränderung des Phosphorylierungsmusters und der Veränderung der Viskositätseigenschaften (Endviskosität, Peaktemperatur) gelten die im Zusammenhang mit den

10 erfindungsgemäßen Pflanzenzellen gemachten Angaben.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Stärken, vorzugsweise Weizenstärken, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens 0.1 nmol C6-P mg<sup>-1</sup>

15 Stärke, insbesondere von mindestens 0.5 nmol C6-P mg<sup>-1</sup>, bevorzugt von mindestens 1 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke, besonders bevorzugt von mindestens 2 C6-P nmol mg<sup>-1</sup> Stärke, insbesondere von mindestens 5 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke, ganz besonders bevorzugt von mindestens 10 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke und/oder eine erhöhte Endviskosität und/oder eine verringerte Peaktemperatur aufweisen, wobei

20 die erfindungsgemäße Stärke in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens 100 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke aufweist, insbesondere von höchstens 50 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke oder von höchstens 25 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke.

25 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Stärke dadurch gekennzeichnet sein, daß sie in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens 15 C6-P nmol mg<sup>-1</sup> Stärke aufweisen, wobei die erfindungsgemäße Stärke in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens 100 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke aufweist, insbesondere

30 von höchstens 50 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke oder von höchstens 25 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Stärken, vorzugsweise Weizenstärken, dadurch gekennzeichnet, daß die

erfindungsgemäßen Stärken nach Verkleisterung Gele bilden, die im Vergleich zu Gelen von entsprechenden chemisch phosphorylierten Stärken gleichen Phosphatgehaltes und/oder im Vergleich zu Gelen von Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweisen.

5

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Stärken dadurch gekennzeichnet sein, daß die Phosphatgruppen zu einem überwiegenden Teil an die Amylopektinkomponente der Stärke gebunden vorliegen, während die Amylose nur einen sehr geringen Gehalt an kovalent gebundenen Stärkemonophosphatestern aufweist. Im Vergleich zu chemisch phosphorylierten Stärken vergleichbarem C-6- Phosphatgehaltes zeichnen sich die erfindungsgemäßen Stärken der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dadurch aus, daß die Amylose der erfindungsgemäßen Stärken weniger stark phosphoryliert ist.

15

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Stärken dadurch gekennzeichnet sein, daß die Amylosekomponente dieser Stärke im Vergleich zur Amylosekomponente chemisch phosphorylierter Stärke, die vorzugsweise einen gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere aufweist, einen verringerten Gesamtposphatgehalt in der Amylosekomponente enthält.

20

Methoden zur Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes sind dem Fachmann bekannt und sind unten (s. Methoden) beschrieben.

25

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die erfindungsgemäße Stärke dadurch gekennzeichnet sein, daß der per  $^{31}\text{P}$ -NMR (Kasemsuwan und Jane (Cereal Chemistry 73 (6), (1996), 702-707) nachweisbare Gesamtposphatgehalt der Amylosekomponente dieser Stärke im Vergleich zur Amylosekomponente von chemisch phosphorylierter Stärke gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere, die aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen hergestellt wurde, um mindestens 5%, bevorzugt um mindestens 20%, insbesondere um mindestens 50% und besonders bevorzugt um mindestens 80% verringert ist.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Stärken dadurch gekennzeichnet sein, daß sie im Vergleich zu chemisch phosphorylierten Stärken ein verändertes Phosphorylierungsmuster aufweisen.

Der Begriff verändertes Phosphorylierungsmuster wurde im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen bereits definiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich um Stärken von monokotyledone Nutzpflanzen, wie z.B. Roggen-, Gerste-, Hafer-, Weizen-, Hirse-, Reis- und Maisstärke. Bevorzugt sind Weizen-, Reis- und Maisstärke, besonders bevorzugt ist Weizenstärke.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer oben beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanze(nzelle) und/oder aus stärke-speichernden Teilen einer solchen Pflanze und/oder aus dem erfindungsgemäßen Vermehrungsmaterial. Vorzugsweise umfaßt ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen und/oder stärke-speichernder Teile dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen und/oder des erfindungsgemäßen Vermehrungsmaterials vor dem Ernten. Verfahren zur Extraktion der Stärke von Pflanzen oder von stärke-speichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen stärke-speichernden Pflanzen beschrieben, z. B. in "Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum-Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; Maisstärke: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996) 54-57, die Extraktion von

Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das sogenannte "wet milling" erreicht). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Mühlen, Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

5

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner erfindungsgemäße Stärke, die durch das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren nachträglich modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch erfindungsgemäß definierte Stärken, die nachträglich chemisch und/oder physikalisch modifiziert worden sind.

15

Verschiedene Möglichkeiten zur chemischen/physikalischen Modifizierung werden weiter unten beschrieben.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Eingriffe in einer Pflanze kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen und/oder physikalischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen und physikalischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch:

- Hitzebehandlung,
- Säurebehandlung,
- Erzeugung von Stärkeethern
  - Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether,
  - O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether
- Erzeugung von vernetzten Stärken

30



- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten
- Oxidation und
- Veresterungen, welche zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegenden Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Stärken im industriellen Bereich, vorzugsweise zur Herstellung von Lebensmitteln.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Weizenmehl, das die erfindungsgemäßen Stärken enthält. Das erfindungsgemäße Weizenmehl zeichnet sich u.a. durch veränderte Backeigenschaften im Vergleich zu herkömmlichen Weizenmehlen aus. Verfahren zur Herstellung von Weizenmehl aus Weizenkörnern sind dem Fachmann bekannt. Das erfindungsgemäße Weizenmehl kann mittels dieser Verfahren aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen sowie aus dem erfindungsgemäßen Vermehrungsmaterial isoliert werden.

Die Figuren zeigen:

Figur 1: Schematische Darstellung eines RVA-Profiles

Figur 2: Plasmidkarte des Vektors pUbi2afp

Figur 3: Plasmidkarte des Vektors pUbiR1

Figur 4: Plasmidkarte des Vektors p35SAcS (Derivat von pUC18 (Pietrzak M. et al., Nucleic Acids Res. 14, (1986), 5857-5868): enthält das pat-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* (Wohlleben et al., Gene 70, (1988), 25-37) unter der Kontrolle des CaMV35S Promotors.

Figur 5: Plasmidkarte des Vektors pAct1-Fneo/Calgus (pUC19-Derivat (Yannish-Perron et al., 1985, Gene 33: 103-119): entstanden aus pAct1-Fneo (Müller et al., Plant Science 114, (1996), 71-82) und pCalgus, das den CaMV35S Promotor (s. beispielsweise US-A-5,352,605), das Adh1 Intron aus Mais (Genes Dev 1987 Dec;1(10):1183-200) und das beta-Glucuronidase (GUS)-Gens (The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression in: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression, Academic Press (1992), 23-43) enthält.

## Methoden:

Bestimmung des Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere (= C6-P-Gehalt) der Stärke (Nielsen et al. Plant Physiol. 105, (1994), 111-117):

- 5 Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg Stärke in 500 µl 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von den Überständen werden 7 µl mit 193 µl Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im Photometer bei 340 nm
- 10 durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2 µl Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (von Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

- 15 Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes der Stärke:

Vor Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes der Stärke muß die Stärke vollständig getrennt werden von phosphorylierten Nicht-Glukanen, wie z.B. Phospholipiden.

- 20 Die Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes kann nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118) folgendermaßen bestimmt werden: Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl 10%iger ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 500 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert.

- 25 Anschließend wird ein 20 µl Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 1 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert. Es folgt eine photometrische Bestimmung bei 820nm unter Berücksichtigung einer Phosphat-Eichreihe als Standard.

- 30 Bestimmung der Gelfestigkeit (Texture Analyzer):

2,5 g Stärke (TS) werden in 25 ml H<sub>2</sub>O im RVA-Gerät verkleistert (s. Bestimmung der Viskositätseigenschaften mittels eines Rapid Visco Analyzers (RVA)) und anschließend für 24 h bei Raumtemperatur gelagert. Die Proben werden unter der

Sonde (zylindrischer Stempel mit planer Oberfläche) eines Texture Analysers TA-XT2 der Firma Stable Micro Systems (Surrey, UK) fixiert und die Gelfestigkeit unter folgenden Geräteeinstellungen bestimmt:

	-	Test-Geschwindigkeit	0,5 mm/s
5	-	Eindringtiefe	7 mm
	-	Kontaktfläche	113 mm <sup>2</sup>
	-	Druck	2g

Bestimmung der Viskositätseigenschaften (z.B. Endviskosität) mittels eines Rapid  
10 Visco Analyzers (RVA):

2.5 g Stärke (Trockengewicht) werden in 25 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und für die  
Analyse in einem Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet  
Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) verwendet. Der Betrieb des  
Gerätes erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Viskosität  
15 der wäßrigen Lösung der Stärke wird die Stärkesuspension zunächst für eine Minute  
auf eine Temperatur von 50°C gebracht und anschließen von 50°C auf 95°C erhitzt,  
mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro Minute. Anschließend wird die Temperatur  
für 2,5 Min bei 95°C gehalten. Danach wird die Lösung von 95°C auf 50°C  
abgekühlt, mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro Minute. Abschließend wird die  
20 Temperatur für weitere 6 Minuten bei 50°C gehalten. Während der gesamten Dauer  
wird die Viskosität bestimmt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne sie in irgendeiner Hinsicht zu  
25 beschränken:

#### Beispiel 1

Herstellung des Vektors pUbiR1 zur Transformation von Weizenpflanzen

30

Zur Herstellung des Vektors pUbiR1 wurde zunächst der Vektor pUbi.cas  
folgendermaßen hergestellt:

Der Vektor pUbi2afp (s. Figur 2) wurde partiell mit den Restriktionsenzymen

PstI/EcoRI geschnitten. Das daraus resultierende 4,19 Kb- Fragment, bestehend aus

dem pUC19 Vektor (Yannish-Perron et al., 1985, Gene 33: 103-119), dem 1,5 Kb großen Ubiquitin- Promotor sowie dem ersten Exon des ubi-Gens und einem verkürzten Ubiquitin1-Intron (Clal-Deletion) (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18, (1992), 675-689) wurde nach Gelelektion weiter verwendet.

- 5 Aus dem Vektor pAct.cas (Produktnummer Cambia TG0063 der Firma Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australien) wurde der nos-Terminator als PstI/EcoRI Fragment isoliert und eine Ligation der beiden Fragmente zum Vektor pUbi.cas durchgeführt.

- 10 Anschließend wurde die cDNA des Kartoffel-R1-Gens (SEQ ID No.1) als partieller Verdau (SmaI/Asp718-Fragment) aus dem Vektor pRL2 (WO97/11188, Beispiel 4, hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Nummer DSM 10225) isoliert und in den Vektor pUbi.cas (Restriktion mit SmaI/Asp718) integriert.

- 15 Das resultierende Konstrukt wurde als pUbiR1 (s. Figur 3) bezeichnet. Dieses Konstrukt umfaßt die codierende Region der R1 cDNA aus Kartoffel, die unter Kontrolle des Ubiquitinpromoters (Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) steht, sowie als zusätzliche Regulationseinheiten das 1. Exon des ubi-Gens (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18, (1992), 675-689) und das verkürzte 1. Intron (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18, (1992), 675-689), wobei das interne Clal-Fragment deletiert ist).

20

## ● Beispiel 2

25

Herstellung von Weizenpflanzen, die ein R1-Gen aus *Solanum tuberosum* exprimieren, und Analyse des Phosphatgehaltes der Stärken dieser Pflanzen

- 30 Zur Weizen-Transformation wurde die biolistische Transformationsmethode verwendet (Becker et al., Plant J. 5 (2), (1994), 229-307). Der Vektor pUbiR1 und zur biolistischen Kotransformation die Vektoren p35SAcS (s. Fig. 4) bzw. pAct1-Fneo/Calgus (Müller et al., Plant Science 114, (1996), 71-82, s. Fig. 5) wurden in gleichen molaren Verhältnissen im DNA-Partikel Fällungsansatz eingesetzt.

Der Vektor p35SAcS wurde folgendermaßen hergestellt: Das *pat*-Gen aus *S. viridochromogenes* (Wohlleben et al., Gene 70, (1988), 25-37) wurde über eine Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Die eingesetzten Primer wurden so konzipiert, daß an beiden Seiten des Amplifikates eine *Bam*HI-Schnittstelle geschaffen wurde.

- 5 Das *Bam*HI-Fragment wurde im Anschluß in die zwischen den 35S-Promotor und den 35S-Terminator des Vektors pDH51 (Pietzrak et al., Nucleic Acids Res. 14, (1986), 5857-5868) gelegenen *Bam*HI-Schnittstelle kloniert. Die Kassette, enthaltend den 35S-Promotor, das *pat*-Gen und den 35S-Terminator, wurde als *Eco*RI-Fragment ausgeschnitten und in die *Eco*RI-Schnittstelle des Vektors pUC18  
10 (Pietzrak et al., Nucleic Acids Res. 14, (1986), 5857-5868) kloniert.

- Als Zielzellen zur Transformation wurden Skutelli 14 Tage alter unreifer Embryonen von Weizenpflanzen verwendet. Nach der Transformation erfolgte die *in vitro* Kultur auf MS<sup>-</sup> Medium (PCT/EP97/02793) enthaltend 2 mg/l 2,4-D (=2,4-Dichlorophenoxy-Essigsäure). Zwei Wochen nach der Transformation erfolgte die Subkultur auf dem  
15 gleichen Medium, dem zusätzlich 2 mg/l Phosphinotricin bzw. 150 mg/l Kanamycinsulfat zugesetzt wurde. Nach weiteren zwei Wochen wurden die sich entwickelnden Kalli auf Regenerationsmedium (MS<sup>-</sup>Medium mit 0,1 mg/l 2,4-D und 2 mg/l PPT bzw. 150 mg/l Kanamycin) umgesetzt. Entwickelnde Sprosse wurden auf halbkonzentriertes MS<sup>-</sup> Medium ohne 2,4-D und Phosphinotricin bzw. Kanamycin  
20 transferiert und anschließend in Erde überführt. Etwa 14 Tage nach der Etablierung in Erde erfolgte eine Identifizierung transgener Pflanzen durch zweimaliges Besprühen mit einer wässrigen Lösung mit 150 und 200 mg/l Phosphinotricin 0,1% Tween 20 (ICI America, entspricht Polysorbat 20) bzw. durch zweimaliges  
25 Besprühen mit 2,5% Kanamycinsulfat, 0,1% Tween 20.

#### Expression des Kartoffel-R1 Gens in T<sub>0</sub>-Pflanzen

- Die Expression des Kartoffel-R1 Gens in transgenen Weizen T<sub>0</sub>-Pflanzen wurde durch Northern- und Western-Blot Analysen und durch die enzymatische Bestimmung des Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere der Stärke  
30 aus Karyopsen (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 111-117) nachgewiesen. R1-Protein wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen das Kartoffel-R1 Protein (Ritte et al., Plant J. 21(4), (2000), 387-391) in transgenen Weizenpflanzen detektiert. Zum Screenen der transgenen Pflanzen wurden Proteinextrakte aus dem Endosperm unreifer, ca. 20 Tage alter Karyopsen, verwendet.

Zur C6-Phosphatbestimmung wurde Stärke transgener T<sub>0</sub>-Pflanzen aus unreifen und reifen Weizenkaryopsen isoliert. Die Karyopsen wurden im Mörser zu Pulver zerrieben. Nach Zugabe von 15 ml 100 mM Tris-Puffer, pH 8,0 wurde die

Suspension durch ein 100 µm Sieb filtriert und die Stärke durch Zentrifugation (2600

5 g, 5 min, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Stärkepellet wurde anschließend in 2 ml 100 mM Tris-Puffer, pH 8,0 resuspendiert und auf eine 8 ml Percollgradienten überführt. Durch 15 min. Zentrifugation bei 170 g, 4°C pelletierte die Stärke. Das Stärkepellet wurde anschließend dreimal mit 10 ml 100 Tris-Puffer, pH 8,0 gewaschen. Abschließend wurde die Stärke durch eine Aceton-Inkubation

10 entfettet und getrocknet.

Die Bestimmung des C6-P-Gehaltes erfolgte über eine Glukose-6-phosphat-Bestimmung mittels eines optisch-enzymatischen Tests (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 111-117) in der oben beschriebenen Weise.

15 Die Untersuchungen zeigten, daß von den in Southern Blot Analysen positiven Weizen-T<sub>0</sub> Pflanzen etwa 50% der Linien in den Karyopsen eine Stärke synthetisierten, die einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen der Varietät Florida aufwies. Tabelle 1 zeigt die Daten  
20 für einige ausgewählte Linien.

Analyse der geselbsteten Nachkommen

Saatgut, das durch Selbstung R1-exprimierender Parentallinien erhalten wurde,

● wurde ausgesät und die Segregationsverhältnisse ermittelt. Durch Southern- und

25 Northern-Blot Analysen konnte sowohl die Integration als auch die Expression des R1-Gens in den T<sub>1</sub>-Nachkommen verschiedener Linien nachgewiesen werden. Von diesen Linien wurde der Gehalt an Phosphat in C6-Position der Stärke ermittelt. Tabelle 1 zeigt die Daten für einige ausgewählte Linien.

Tabelle 1:

Linie Nr.	C6P in nmol/mg	Gene- ration	Standard- abweichung
Wildtyp Varietät Florida	Nicht detektierbar	-	0.0
19	2.8	T0	0.2
20-25	6.7	T1	0.2
37	1.4	T0	0.3
40A-11-8	10.7	T2	0.7

## Beispiel 3

10

RVA-Analyse der Stärke von Pflanzen transgener Weizenpflanzen, die ein R1-Gen aus *Solanum tuberosum* exprimieren, sowie Untersuchungen zur Gelfestigkeit

15

Die Stärken der in den Beispielen 1 und 2 beschriebenen Weizenpflanzen wurden einer RVA-Analyse unterworfen.

●

Die Ergebnisse der RVA-Analyse (Durchführung: s. Methoden) zeigten, daß das Viskositätsverhalten der Stärken der transgenen Weizenpflanzen, die ein R1-Gen aus *Solanum tuberosum* exprimieren im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Weizenpflanzen (Varietät Florida) deutlich

20

verändert ist (s. Tabelle 2).

Tabelle 2:

Linie Nr.	RVA	RVA	RVA	RVA	RVA
	Max	Min	Fin	Set	T
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Wildtyp (Florida)	100	100	100	100	100
19 (T0)	98.7	113.8	116.8	120.7	102
20-25 (T1)	155.3	190	193.8	198.8	99
37 (T0)	143.8	156.2	148.8	139	101
40-11-8 (T2)	156.2	185.5	187.7	190.6	97

## Legende:

RVA = Rapid Visco Analyzer

Max = s. Figur 1

Min = s. Figur 1

Fin = Endviskosität, s. Figur 1

Set = Setback = Differenz aus Min und Fin, s. Figur 1

10 T = Verkleisterungstemperatur, s. Figur 1

Die Prozentwerte sind auf den Wildtyp (= 100 %) bezogen.

Auch die Gelfestigkeiten der Stärken (Bestimmung der Gelfestigkeit: s. Methoden)

der transgenen Weizenpflanzen, die ein R1-Gen aus *Solanum tuberosum* exprimieren, unterscheiden sich sowohl von Stärken aus entsprechenden nicht

15 genetisch modifizierten Wildtyp-Weizenpflanzen (Varietät Florida) als auch von

● Wildtyp-Stärken (Varietät Florida), die nachträglich chemisch phosphoryliert wurden (s. Tabelle 3).

Im Gegensatz zu den chemisch phosphorylierten Stärken vergleichbaren

Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere zeigen die Gele der

20 erfindungsgemäßen Stärken nach Verkleisterung eine erhöhte Gelfestigkeit im

Vergleich zu Gelen von Stärken von Wildtyp-Pflanzen. Im Gegensatz dazu weisen

die chemisch phosphorylierten Stärken, die nach der bei Lim und Seib (Cereal Chem. 70 (2), (1993), 137-144) beschriebenen Methode hergestellt wurden, eine

verringerte Gelfestigkeit auf im Vergleich zu Gelen von Stärken von Wildtyp-

25 Pflanzen.



Tabelle 3:

Linie Nr.	Gelfestigkeit (TA) (%)	Phosphatgehalt in C6- Position in $\mu\text{mol}$ Phosphat/g Stärke
Wildtyp (Florida)	100	Nicht detektierbar
19 (T0)	167	2.8
20-25 (T1)	192	6.7
37 (T0)	168	1.4
40-11-8 (T2)	224	10.7
Chemisch phosphorylierte Wildtyp-(Florida)-Stärke		
STMP1	84	2.1
STMP6	75	6.5
STMP8	67	11.5

TA = Texture Analyzer

- 5 Die Prozentwerte sind auf den Wildtyp (= 100 %) bezogen.

#### 1 Beispiel 4

DSC-Analyse der Stärke von Pflanzen transgener Weizenpflanzen, die ein R1-Gen aus *Solanum tuberosum* exprimieren

- 15 Die Stärken der in den Beispielen 1 und 2 beschriebenen Weizenpflanzen wurden einer DSC-Analyse unterworfen.

Die Peaktemperatur wurde mit einem Gerät der Firma Perkin Elmer (Gerätbezeichnung: DSC-7) unter Verwendung von Großraumkapseln durchgeführt,

- 20 wobei die zu untersuchende Probe ein Verhältnis von Stärke zu

Gesamtwassergehalt von ca. 1:4 aufwies und die Messung in einem Temperaturbereich von 10°C bis 160°C durchgeführt wurde bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 10°C/min.

- 5 Die Ergebnisse der DSC-Analyse zeigen (Tabelle 4), daß die Peaktemperatur der Stärken der transgenen Weizenpflanzen, die ein R1-Gen aus *Solanum tuberosum* exprimieren im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Weizenpflanzen (Varietät Florida) und auch im Vergleich zu nachträglich chemisch phosphorylierten Stärken vergleichbaren Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere eine verringerte Peaktemperatur  $T_p$  aufweisen.

Tabelle 4:

Probe	Wassergehalt der Probe (%)	Stärke (Trockengewicht): Wasser (Gesamtwassergehalt)	Peaktempera- tur in °C (erstes Peakmaximum)	Weitere Peakmaxi- ma in °C
Wildtyp (Florida)	16.6	1 : 4.01	61	101
19 (T0)	10.5	1 : 3.99	58	100
20-25 (T1)	16.9	1 : 4.05	55	100
40-11-8 (T2)	16.9	1 : 3.98	56	100
STMP2*	10.9	1 : 4.00	60	101
STMP6	10.7	1 : 4.00	61	101

- 15 \* Die chemisch phosphorylierte Stärke STMP2 weist einen Phosphatgehalt in C6-Position von 3.0  $\mu\text{mol}$  Phosphat/g Stärke auf. Alle anderen Phosphatwerte sind in Tabelle 3 dargestellt.

SEQ ID No. 1 (R1 cDNA Kartoffel, Nucleotid-Sequenz 5061 bp, codierende Region:  
bp 216 bis bp 4607):

5 gaattgtaatacgaactcactatagggcgaattgggtaccgggccccccctcgaggctcgacgggtatcgataagcttgat  
atcgaattcgcgccgcttttgcctcgtgaattcatcttcacgaattctcgacgcttctcgctaatttctcgttacttacta  
gaaatcgacgtttctagctgaacttgagtgaattaagccagtgaggatagagtaattccttagggaataacttgctg  
taccagggtattcctaacctcaacagtggtggaacataaaagtagaatcagtcctccttggttgagggaattcttgttgc  
aacaacaagtgatctcgaaatcacctttatcaactgagtttcgaggttaacagggttaaggtgcagaaaaagaaaata  
10 cctatgggaaagaaccgtgcttttctagttctcctcatgctgtacttaccactgatacctcttctgagctagcagaaaagtt  
cagctctagaaggaatattgagctacaggttgatgttaggcctcccacttcagggtgatgtgctcttctggtgatttcaagct  
acaaatggtagtataaactgttttgcactggggggcagtaaagttcggaagaacatgggtctcttctaataatgatc  
gtccagatgggaccaaagtgataagaacaaagcacttagaactccattgttaaactcggctctaactccatcctgag  
actggagatacgggacactgctatcgaagctattgagttctcatatacgaatgaagcctacgataaatggataaagaa  
15 taatggtggcaatttctgtgtcaaatgtcaagaaaagagatacagaggccagatgttccagttcctgaggagcttgat  
agatccaatcatatttgaggtgggagaggaagggaaaacagaattacaccctgagaaagagaaggaggaatat  
gaggctgctcgaactgagctacaggaggaatatgctcgtggtgcttcatacaggacattcgagcaaggctaacaa  
aaactaatgataaaagtcaaagcaaagaagagcctctcatgtaacaaagagtgaataacctgatgaccttgccca  
agcacaagcttacattaggtgggagaaagcaggaaagccgaactatcctccagaaaagcaaattgaagaactcg  
20 aagaagcaagaagagaattgcaacttgagcttgagaaaggcattacccttgatgagttgcggaaaaagattacaaa  
aggggagataaaaactaaggcggaaaagcacgtgaaaagaagctctttgccgttgaaagaatccaaagaaaga  
agagagactttgggcagcttataataagtatccttcagtcctgcagtacaagtaaaaaggcttgaagaaccac  
cagccttatctaaaattaagctgtatgccaggagaaggaggagcagattgatgatccgatccttaataaaaagatct  
ttaaggctgatgatggggagctactggtactggttagcaaagtcctctggaagacaaaagtacatatagctacagat  
25 ctgaatcagccaattactctcactgggcattatccaaaagtcgtggagagtggatgggtaccacctcaagcatattgcc  
tctggatcaattatttagacaaggctgccgaaacacctttccgccagttctctgatggtctaacttctaaggtaaat  
cttggatatagtaattgaagatggcaatttctggggatgccattgttcttctgctggtgaaaaatggattaagaaccaa  
gggtcggatttctatgttgacttcagtgctgcacaaattagcactcaaggctgctggggatggcagtggaactgcaa  
agtcttactggataaaatagcagatatggaaagtgaggctcagaagtcattatgcaccgggttaatatgtctgctgact  
30 ttagatagaagatgccactagtgtggtgaacttggtttactggaattcttgatggatgaggttcattggctacaaggcaac  
tgatatggaacaaaaactataacgtaaaaccacgtgaaataagcaaggctcaggacagacttacagacttgttgca  
gaatgctttcaccagtcaccctcaataaccgtgaaatttgcggatgattatgtcaactgttgacgtggaggtgaagggg  
atgtaggacagcgaattagggtgaaatttgggtcatccagaggaaaaatgactgcaaggggtggtatgatggaaga  
atggcatcagaaattgcataataactagtcctgatgatgttgatctgtcaggcattgattgactacatcaagagtga

tttgatcttggtgtttattggaaaaccctgaatgagaacggaataacaaaagagcgtctttgagttatgaccgtgctatc  
 cattctgaaccgaatttttagaggagatcaaaagaatggtctttgctgatttaggtcactatatgagaacattgaaggct  
 gttcattcaggtgcagatcttgagctgctattgcaaactgcatgggctacaaaactgagggagaaggctttatggttgg  
 agtccagataaatcctgtatcaggcttgccatctggcttcagggcctcctcattttgtcttagaccatgtggaagataaa  
 5 aatgtggaaactcttcttgagggattgctagaggctcgtgaggagcttaggcccttgcttctcaaaccaacaaccgtct  
 aaaggatctgctgttttggacatagcacttgattctacagttagaacagcagtagaaaggggatatgaagaattgaac  
 aacgctaactcctgagaaaatcatgtacttcatctccctcgttcttgaaaatctcgactctctgtggacgataatgaagat  
 ctgtttattgcttgaagggatggaatcaagctcttcaatgtccaatggtggagacaaccattgggctttatttgcaaaag  
 ctgtacttgacagaatccgtcttgacttgcaagcaaggcagagtggtaacctcacttattgcagccatctgccgaatat  
 10 ctaggatcaatccttggggtggaccaatgggcttgaacataattactgaagaaattatacgtgctggatcagcagcttc  
 attatcctctcttcttaatagactcgatcccgtgcttcggaaaactgcaaatctaggaagttggcagattatcagtcagtt  
 gaagccgttggatatgttgcgttggatgagttgcttcagttcagaatgaaatctacaagaagcccacgatcttagta  
 gcaaactctgttaaaggagaggaggaaattcctgatggtgctgttgcctgataacaccagacatgccagatgttctt  
 cacatgtttctgttcgagctagaaatgggaaggttgccttgcacatgcttgcacaaatattggctgacctccaagc  
 15 aaaggaaggaaggattttgctcttaaagcctacacctcagacataatctatagtgaggtgaatgagattgagctcca  
 aagttcaagtaacttggtagaagctgaaactcagcaacacttagattggtgaaaaagcaatttgggtggttgcac  
 atatcagcagatgaattcacaagtgaatggttggagctaaatcacgtaattgcatactgaaaggaaaagtcctt  
 cctcgggtgggaattcctacgtcagtagctctccatttggagtctttagagaaagtaacttgcagacgacataaatcagggga  
 gtggcaaaagagttgcaaattctgacgaaaaaactatctgaaggagacttcagcgctcttggtgaaattcgcacaaac  
 20 gattttagatctttcagcaccagctcaattggtcaaagagctgaaggaaaagatgcaggggttctggcatgccttggcct  
 ggtgatgaagggtcaaagcgggtgggaacaagcatggatggccataaaaaagggtgtgggcttcaaaatggaatgag  
 agagcatacttcagcacaaggaaggtgaaactggatcatgactatctgtgcatggctgtccttgttcaagaaataataa  
 atgctgattatgcatttgcattcacacaaccaacccatctccggagacgactcagaaatatatgccgaggtggtcag  
 25 gggccttggggaaacacttgttggagcttaccaggaagctgctttagtcttctgcaagaaaaaggatctcaactctc  
 ctcaagtgttaggttaccacaagcaaacccgatcgccctttcataaaaagatctatcatctccgatctgattccaatgggg  
 aagatttgaagggttatgccggtgctggcctctacgacagtgtagcaatggatgaggagggaaaaagttgtaattgatta  
 ctctccgacccattgataactgatggttaactccgccagacaatcctgtccaacattgctcgtgctggacatgctatcga  
 ggagctatatggctctcctcaagacatcgaggggtgtagtgaggatggaaagatttatgtcgttcagacaagacctca  
 gatgtgatcatattctcgttgtatgttgcagagaagaccatagatgtgatcatattctcatggtatcagatctgtgaccact  
 30 tacctcccatgaagttgcctgtatgattatacgtgatcaaagccatcacatcatgttcacctcagctattggaggagaa  
 gtgagaagtaggaattgcaatatgaggaataataagaaaaactttgtagaagttaaattagctgggtatgatataggg  
 agaaatgtgtaaacattgtactatatatagtatacacacgcattatgtattgcattatgcactgaataatatcgagcatc  
 aaagaagaaatcctttgagtggttcaattgccgcggccggaattcctgcagccgggggatccactagttctagag  
 cgccgccaccgcgggtggagctccagctttgttcccttagtgagggttaattt

SEQ ID No.2 (R1-Protein aus Kartoffel, Aminosäuresequenz: 1464 Aminosäuren)

5

MsnslgnnlllyqgflststvhlehsrisppcvvggnslfqqqvsksplstefrgnrllkvqkkkipMgknrafssssphavltdt  
sselaekfslegnielqvdrpptsdvsfvdqatngsdklflhwgavkfgketwslpndrpdgtkvyknkalrtpfvk  
sgsnsilrleirdtaieaiefliydeaydkwiknnggnfrvklrkeirgpdvsvpeelvqiysylrwerkkgkqnytpekek  
eeyeaartelqeeiargasiqdirarltktndksqskeeplhvtkseipddlaqaqayirwekagkpnyppekqieele

10

earrelqlelekgitldelrkkitkgeiktkaekhvkrsssfaveriqrkkrdfgqlinkypsspavqvkvleppalskikly  
akekeeqiddpilnkkikfvddgellvlvakssgktkvhiatdlnqpithwalsksrgewMvppssilppgsiildkaae  
tpfsasssdgltskvqsldiviedgnfvvgMpfvllsgekwiknqgsdfyvdvsaasklalkaagdsgstakslldkiadM

15

eseaqksfMhrfniaadliedatsagelgftgilvwMrfMatrqliwnknynvkpreiskaqdrldllqnaftshpqyre  
lrMiMstvgrggegdvqqrirdeilviqrkndckggMMeewhqklhnntspddvvicqalidyiksdldgvywktln

20

engitkerllsydraihsepnfrgdqkngllrldlghyMrtlkavhsgadlesaiancMgyktegegfmvgvqinpvsgl  
psgfqgllhfvdhvedknvetlleglleareelrpillkpnrrkdlldialdstvrtavergyeelnnanpekiMyfislvle  
nlalsvddnedlvyclkgwnqalsMsnggdnhwalfakavldrirlalaskaewyhhllqpsaeylgsilgvdqwalni  
fteeiiragsaasllnrlpvlrktanlgswqiispveavgyvvvvdellsvqneykkptilvansvkggeeeipdgav  
alitpdMpdvlshvsvarngkvfatcfdpniladlqakegrilllkptpsdiiysevneielqsssnlveaetsatlrivkk

25

qfggcyaaisadeftseMvgaksrniaylkgkvpssvgiptsvalpfgvfevlsvddinqqvakelqiltkkllsegdfsalg  
eirttildsapaqlvkelkekMqgsgMpwpdegpkeweawMaikkvwaskwnerayfstrkvldhdylcMa  
vlvqeiinadyafvihttnpssgddseiyaevvrglgetlvgaypgralsfickkkdlnspqvlgygskpiglfikrsiifrsd  
sngedlegyagaglydsvpMdeeeekvvidyssdpltdgnfrqtilsniaraghaieelygspqdiegvvrdgkiyvva

30

trpqM

## Patentansprüche

1. Monokotyledone genetisch modifizierte Pflanzenzelle, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht und das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- a) Nucleinsäuremolekülen, die die codierende Region der unter Seq ID No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz umfassen;
  - b) Nucleinsäuremolekülen, die ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* mit der unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
  - c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Derivat der unter Seq ID No. 1 angegebenen Nukleotidsequenz darstellen; und
  - d) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.
2. Pflanzenzelle nach Anspruch 1, die eine erhöhte biologische Aktivität von R1-Protein im Vergleich zu einer entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzelle aufweist.
3. Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 oder 2, die eine Stärke synthetisiert, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere aufweist.
4. Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, die eine Stärke synthetisiert, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Endviskosität und/oder eine verringerte Peaktemperatur aufweist.
5. Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, die eine Stärke synthetisiert, die nach Verkleisterung ein Gel bildet, das im Vergleich zu einem Gel aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweist.

6. Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, die aus einer Pflanze der Gruppe bestehend aus Weizen, Reis, Gerste, Hafer, Hirse, Roggen und Mais stammt.

5

7. Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, die aus einer Weizenpflanze stammt.

8. Pflanzenzelle nach Anspruch 7, die eine Stärke synthetisiert, die in C6-

10 Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens  $0.1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke aufweist.

9. Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, worin eine Zelle einer monokotyledonen Pflanze genetisch  
15 modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht.

10. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8.

20

11. Pflanze nach Anspruch 10, die in ihren stärkespeichernden Organen eine Stärke synthetisiert, die im Vergleich zu Stärke aus stärkespeichernden Organen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten  
● Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere aufweist.

25

12. Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 11, die eine Reis-, Weizen- oder Maispflanze ist.

13. Verfahren zur Herstellung einer Pflanze nach einem oder mehreren der  
30 Ansprüche 10 bis 12, worin

(a) eine Zelle einer monokotyledonen Pflanze genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht;

- (b) aus der gemäß Schritt (a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und gegebenenfalls
- (c) aus der gemäß Schritt (b) erzeugten Pflanze weitere Pflanzen erzeugt werden.

- 5 14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines Promoters steht, der organspezifisch die R1-Genexpression in stärkepeichernden Geweben vermittelt.
- 10 15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 13 bis 14, das eine Weizenpflanze betrifft.
- 15 16. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 12 enthaltend Pflanzenzellen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8.
- 20 17. Verwendung von Nucleinsäuremolekülen, wie in Anspruch 1 definiert, zur Herstellung von monokotyledonen Pflanzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 12 oder von monokotyledonen Pflanzenzellen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8.
- 25 18. Stärke erhältlich aus einer Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 oder einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 12.
- 30 19. Stärke nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyppflanzen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder eine erhöhte Endviskosität und/oder eine verringerte Peaktemperatur aufweist.
20. Stärke, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyppflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder eine erhöhte Endviskosität und/oder eine verringerte Peaktemperatur aufweist.



21. Stärke, dadurch gekennzeichnet, daß sie in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens  $0.1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke aufweist.
- 5 22. Stärke nach Anspruch 21 dadurch gekennzeichnet, daß sie eine um mindestens 50% erhöhte Endviskosität und/oder eine um mindestens  $1.5^{\circ}\text{C}$  verringerte Peaktemperatur aufweist.
- 10 23. Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß diese Stärke nach Verkleisterung Gele bildet, die im Vergleich zu Gelen von entsprechenden chemisch phosphorylierten Stärken gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere und/oder im Vergleich zu Gelen von Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweisen.
- 15 24. Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Amylosekomponente dieser Stärke im Vergleich zur Amylosekomponente chemisch phosphorylierter Stärke einen verringerten Gesamtphosphatgehalt in der Amylosekomponente enthält.
- 20 25. Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß sie im Vergleich zu chemisch phosphorylierter Stärke ein verändertes Phosphorylierungsmuster aufweist.
- 25 26. Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Weizenstärke handelt.
- 30 27. Verfahren zur Herstellung einer Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 26 umfassend die Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 12.
28. Verwendung einer Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 26 im industriellen Bereich, vorzugsweise zur Herstellung von Lebensmitteln.

29. Weizenmehl, enthaltend eine Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 26.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht, das ein Protein mit der biologischen Aktivität eines R1-Proteins codiert. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zu deren Herstellung. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie einen im Vergleich zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten monokotyledonen Pflanzen erhöhten Phosphatgehalt und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder eine erhöhte Endviskosität im RVA-Profil und/oder eine verringerte Peaktemperatur in der DSC Analyse und/oder eine erhöhte Gelfestigkeit im Texture Analyser aufweist. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

# SEQUENCE LISTING

<110> Aventis CropScience GmbH

<120> Monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren

<130> 2000/M 233

<140>

<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5061

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (216)..(4607)

<400> 1

```

gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggtaccg ggccccccct cgagggtcgac 60
ggtatcgata agcttgatat cgaattcgcg gccgcttttg cttcgtgaat tcattcttcac 120
cgaattttctc gacgcttctt cgctaatttc ctcgttactt cactagaaat cgacgtttct 180
agctgaactt gagtgaatta agccagtggg aggat atg agt aat tcc tta ggg      233
                               Met Ser Asn Ser Leu Gly
                               1          5

aat aac ttg ctg tac cag gga ttc cta acc tca aca gtg ttg gaa cat      281
Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr Ser Thr Val Leu Glu His
          10          15          20

aaa agt aga atc agt cct cct tgt gtt gga ggc aat tct ttg ttt caa      329
Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly Gly Asn Ser Leu Phe Gln
          25          30          35

caa caa gtg atc tcg aaa tca cct tta tca act gag ttt cga ggt aac      377
Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser Thr Glu Phe Arg Gly Asn
          40          45          50

agg tta aag gtg cag aaa aag aaa ata cct atg gga aag aac cgt gct      425
Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro Met Gly Lys Asn Arg Ala
          55          60          65          70

ttt tct agt tct cct cat gct gta ctt acc act gat acc tct tct gag      473
Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr Thr Asp Thr Ser Ser Glu
          75          80          85

cta gca gaa aag ttc agt cta gaa ggg aat att gag cta cag gtt gat      521
Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Glu Gly Asn Ile Glu Leu Gln Val Asp
          90          95          100

```

gtt	agg	cct	ccc	act	tca	ggg	gat	gtg	tcc	ttt	gtg	gat	ttt	caa	gct	569
Val	Arg	Pro	Pro	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Ser	Phe	Val	Asp	Phe	Gln	Ala	
		105					110					115				
aca	aat	ggg	agt	gat	aaa	ctg	ttt	ttg	cac	tgg	ggg	gca	gta	aag	ttc	617
Thr	Asn	Gly	Ser	Asp	Lys	Leu	Phe	Leu	His	Trp	Gly	Ala	Val	Lys	Phe	
	120					125					130					
gga	aaa	gaa	aca	tgg	tct	ctt	cct	aat	gat	cgt	cca	gat	ggg	acc	aaa	665
Gly	Lys	Glu	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Asn	Asp	Arg	Pro	Asp	Gly	Thr	Lys	
	135				140					145					150	
gtg	tac	aag	aac	aaa	gca	ctt	aga	act	cca	ttt	gtt	aaa	tct	ggc	tct	713
Val	Tyr	Lys	Asn	Lys	Ala	Leu	Arg	Thr	Pro	Phe	Val	Lys	Ser	Gly	Ser	
			155						160					165		
aac	tcc	atc	ctg	aga	ctg	gag	ata	cgg	gac	act	gct	atc	gaa	gct	att	761
Asn	Ser	Ile	Leu	Arg	Leu	Glu	Ile	Arg	Asp	Thr	Ala	Ile	Glu	Ala	Ile	
		170						175					180			
gag	ttt	ctc	ata	tac	gat	gaa	gcc	tac	gat	aaa	tgg	ata	aag	aat	aat	809
Glu	Phe	Leu	Ile	Tyr	Asp	Glu	Ala	Tyr	Asp	Lys	Trp	Ile	Lys	Asn	Asn	
		185					190					195				
ggg	ggc	aat	ttt	cgt	gtc	aaa	ttg	tca	aga	aaa	gag	ata	cga	ggc	cca	857
Gly	Gly	Asn	Phe	Arg	Val	Lys	Leu	Ser	Arg	Lys	Glu	Ile	Arg	Gly	Pro	
	200					205					210					
gat	gtt	tca	gtt	cct	gag	gag	ctt	gta	cag	atc	caa	tca	tat	ttg	agg	905
Asp	Val	Ser	Val	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Gln	Ile	Gln	Ser	Tyr	Leu	Arg	
	215				220					225					230	
tgg	gag	agg	aag	gga	aaa	cag	aat	tac	acc	cct	gag	aaa	gag	aag	gag	953
Trp	Glu	Arg	Lys	Gly	Lys	Gln	Asn	Tyr	Thr	Pro	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	
			235						240					245		
gaa	tat	gag	gct	gct	cga	act	gag	cta	cag	gag	gaa	ata	gct	cgt	ggg	1001
Glu	Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Gln	Glu	Glu	Ile	Ala	Arg	Gly	
		250						255					260			
gct	tcc	ata	cag	gac	att	cga	gca	agg	cta	aca	aaa	act	aat	gat	aaa	1049
Ala	Ser	Ile	Gln	Asp	Ile	Arg	Ala	Arg	Leu	Thr	Lys	Thr	Asn	Asp	Lys	
		265					270					275				
agt	caa	agc	aaa	gaa	gag	cct	ctt	cat	gta	aca	aag	agt	gaa	ata	cct	1097
Ser	Gln	Ser	Lys	Glu	Glu	Pro	Leu	His	Val	Thr	Lys	Ser	Glu	Ile	Pro	
	280					285					290					
gat	gac	ctt	gcc	caa	gca	caa	gct	tac	att	agg	tgg	gag	aaa	gca	gga	1145
Asp	Asp	Leu	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Tyr	Ile	Arg	Trp	Glu	Lys	Ala	Gly	
	295			300						305					310	
aag	ccg	aac	tat	cct	cca	gaa	aag	caa	att	gaa	gaa	ctc	gaa	gaa	gca	1193
Lys	Pro	Asn	Tyr	Pro	Pro	Glu	Lys	Gln	Ile	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Ala	
			315						320					325		
aga	aga	gaa	ttg	caa	ctt	gag	ctt	gag	aaa	ggc	att	acc	ctt	gat	gag	1241
Arg	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp	Glu	
		330						335					340			

ttg cgg aaa aag att aca aaa ggg gag ata aaa act aag gcg gaa aag	1289
Leu Arg Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Ala Glu Lys	
345 350 355	
cac gtg aaa aga agc tct ttt gcc gtt gaa aga atc caa aga aag aag	1337
His Val Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg Lys Lys	
360 365 370	
aga gac ttt ggg cag ctt att aat aag tat cct tcc agt cct gca gta	1385
Arg Asp Phe Gly Gln Leu Ile Asn Lys Tyr Pro Ser Ser Pro Ala Val	
375 380 385 390	
caa gta caa aag gtc ttg gaa gaa cca cca gcc tta tct aaa att aag	1433
Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys Ile Lys	
395 400 405	
ctg tat gcc aag gag aag gag gag cag att gat gat ccg atc ctt aat	1481
Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile Leu Asn	
410 415 420	
aaa aag atc ttt aag gtc gat gat ggg gag cta ctg gta ctg gta gca	1529
Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu Val Ala	
425 430 435	
aag tcc tct ggg aag aca aaa gta cat ata gct aca gat ctg aat cag	1577
Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Ile Ala Thr Asp Leu Asn Gln	
440 445 450	
cca att act ctt cac tgg gca tta tcc aaa agt cgt gga gag tgg atg	1625
Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Arg Gly Glu Trp Met	
455 460 465 470	
gta cca cct tca agc ata ttg cct cct gga tca att att tta gac aag	1673
Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu Asp Lys	
475 480 485	
gct gcc gaa aca cct ttt tcc gcc agt tct tct gat ggt cta act tct	1721
Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asp Gly Leu Thr Ser	
490 495 500	
aag gta caa tct ttg gat ata gta att gaa gat ggc aat ttt gtg ggg	1769
Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe Val Gly	
505 510 515	
atg cca ttt gtt ctt ttg tct ggt gaa aaa tgg att aag aac caa ggg	1817
Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn Gln Gly	
520 525 530	
tcg gat ttc tat gtt gac ttc agt gct gca tcc aaa tta gca ctc aag	1865
Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala Leu Lys	
535 540 545 550	
gct gct ggg gat ggc agt gga act gca aag tct tta ctg gat aaa ata	1913
Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp Lys Ile	
555 560 565	
gca gat atg gaa agt gag gct cag aag tca ttt atg cac cgg ttt aat	1961
Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn	
570 575 580	

att gct gct gac ttg ata gaa gat gcc act agt gct ggt gaa ctt ggt Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu Leu Gly 585 590 595	2009
ttt act gga att ctt gta tgg atg agg ttc atg gct aca agg caa ctg Phe Thr Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu 600 605 610	2057
ata tgg aac aaa aac tat aac gta aaa cca cgt gaa ata agc aag gct Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala 615 620 625 630	2105
cag gac aga ctt aca gac ttg ttg cag aat gct ttc acc agt cac cct Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser His Pro 635 640 645	2153
caa tac cgt gaa att ttg cgg atg att atg tca act gtt gga cgt gga Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly Arg Gly 650 655 660	2201
ggt gaa ggg gat gta gga cag cga att agg gat gaa att ttg gtc atc Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile 665 670 675	2249
cag agg aaa aat gac tgc aag ggt ggt atg atg gaa gaa tgg cat cag Gln Arg Lys Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln 680 685 690	2297
aaa ttg cat aat aat act agt cct gat gat gtt gtg atc tgt cag gca Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala 695 700 705 710	2345
ttg att gac tac atc aag agt gat ttt gat ctt ggt gtt tat tgg aaa Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr Trp Lys 715 720 725	2393
acc ctg aat gag aac gga ata aca aaa gag cgt ctt ttg agt tat gac Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp 730 735 740	2441
cgt gct atc cat tct gaa ccg aat ttt aga gga gat caa aag aat ggt Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys Asn Gly 745 750 755	2489
ctt ttg cgt gat tta ggt cac tat atg aga aca ttg aag gct gtt cat Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His 760 765 770	2537
tca ggt gca gat ctt gag tct gct att gca aac tgc atg ggc tac aaa Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly Tyr Lys 775 780 785 790	2585
act gag gga gaa ggc ttt atg gtt gga gtc cag ata aat cct gta tca Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Ser 795 800 805	2633
ggc ttg cca tct ggc ttt cag ggc ctc ctc cat ttt gtc tta gac cat Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Gly Leu Leu His Phe Val Leu Asp His 810 815 820	2681

gtg gaa gat aaa aat gtg gaa act ctt ctt gag gga ttg cta gag gct	2729
Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala	
825 830 835	
cgt gag gag ctt agg ccc ttg ctt ctc aaa cca aac aac cgt cta aag	2777
Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg Leu Lys	
840 845 850	
gat ctg ctg ttt ttg gac ata gca ctt gat tct aca gtt aga aca gca	2825
Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg Thr Ala	
855 860 865 870	
gta gaa agg gga tat gaa gaa ttg aac aac gct aat cct gag aaa atc	2873
Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu Lys Ile	
875 880 885	
atg tac ttc atc tcc ctc gtt ctt gaa aat ctc gca ctc tct gtg gac	2921
Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Val Asp	
890 895 900	
gat aat gaa gat ctt gtt tat tgc ttg aag gga tgg aat caa gct ctt	2969
Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Leu	
905 910 915	
tca atg tcc aat ggt gga gac aac cat tgg gct tta ttt gca aaa gct	3017
Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp Ala Leu Phe Ala Lys Ala	
920 925 930	
gta ctt gac aga atc cgt ctt gca ctt gca agc aag gca gag tgg tac	3065
Val Leu Asp Arg Ile Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Ala Glu Trp Tyr	
935 940 945 950	
cat cac tta ttg cag cca tct gcc gaa tat cta gga tca atc ctt ggg	3113
His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Ile Leu Gly	
955 960 965	
gtg gac caa tgg gct ttg aac ata ttt act gaa gaa att ata cgt gct	3161
Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Ala	
970 975 980	
gga tca gca gct tca tta tcc tct ctt ctt aat aga ctc gat ccc gtg	3209
Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val	
985 990 995	
ctt cgg aaa act gca aat cta gga agt tgg cag att atc agt cca gtt	3257
Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile Ile Ser Pro Val	
1000 1005 1010	
gaa gcc gtt gga tat gtt gtc gtt gtg gat gag ttg ctt tca gtt cag	3305
Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ser Val Gln	
1015 1020 1025 1030	
aat gaa atc tac aag aag ccc acg atc tta gta gca aac tct gtt aaa	3353
Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Asn Ser Val Lys	
1035 1040 1045	
gga gag gag gaa att cct gat ggt gct gtt gcc ctg ata aca cca gac	3401
Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr Pro Asp	
1050 1055 1060	



atg cca gat gtt ctt tca cat gtt tct gtt cga gct aga aat ggg aag	3449
Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Gly Lys	
1065 1070 1075	
gtt tgc ttt gct aca tgc ttt gat ccc aat ata ttg gct gac ctc caa	3497
Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asp Leu Gln	
1080 1085 1090	
gca aag gaa gga agg att ttg ctc tta aag cct aca cct tca gac ata	3545
Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser Asp Ile	
1095 1100 1105 1110	
atc tat agt gag gtg aat gag att gag ctc caa agt tca agt aac ttg	3593
Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser Asn Leu	
1115 1120 1125	
gta gaa gct gaa act tca gca aca ctt aga ttg gtg aaa aag caa ttt	3641
Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys Gln Phe	
1130 1135 1140	
ggg ggt tgt tac gca ata tca gca gat gaa ttc aca agt gaa atg gtt	3689
Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu Met Val	
1145 1150 1155	
gga gct aaa tca cgt aat att gca tat ctg aaa gga aaa gtg cct tcc	3737
Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser	
1160 1165 1170	
tcg gtg gga att cct acg tca gta gct ctt cca ttt gga gtc ttt gag	3785
Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu	
1175 1180 1185 1190	
aaa gta ctt tca gac gac ata aat cag gga gtg gca aaa gag ttg caa	3833
Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys Glu Leu Gln	
1195 1200 1205	
att ctg acg aaa aaa cta tct gaa gga gac ttc agc gct ctt ggt gaa	3881
Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu	
1210 1215 1220	
att cgc aca acg att tta gat ctt tca gca cca gct caa ttg gtc aaa	3929
Ile Arg Thr Thr Ile Leu Asp Leu Ser Ala Pro Ala Gln Leu Val Lys	
1225 1230 1235	
gag ctg aag gaa aag atg cag ggt tct ggc atg cct tgg cct ggt gat	3977
Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp	
1240 1245 1250	
gaa ggt cca aag cgg tgg gaa caa gca tgg atg gcc ata aaa aag gtg	4025
Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val	
1255 1260 1265 1270	
tgg gct tca aaa tgg aat gag aga gca tac ttc agc aca agg aag gtg	4073
Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val	
1275 1280 1285	
aaa ctg gat cat gac tat ctg tgc atg gct gtc ctt gtt caa gaa ata	4121
Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile	
1290 1295 1300	

ata aat gct gat tat gca ttt gtc att cac aca acc aac cca tct tcc 4169  
 Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser  
 1305 1310 1315

gga gac gac tca gaa ata tat gcc gag gtg gtc agg ggc ctt ggg gaa 4217  
 Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg Gly Leu Gly Glu  
 1320 1325 1330

aca ctt gtt gga gct tac cca gga cgt gct ttg agt ttt atc tgc aag 4265  
 Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys  
 1335 1340 1345 1350

aaa aag gat ctc aac tct cct caa gtg tta ggt tac cca agc aaa ccg 4313  
 Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro  
 1355 1360 1365

atc ggc ctt ttc ata aaa aga tct atc atc ttc cga tct gat tcc aat 4361  
 Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn  
 1370 1375 1380

ggg gaa gat ttg gaa ggt tat gcc ggt gct ggc ctc tac gac agt gta 4409  
 Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val  
 1385 1390 1395

cca atg gat gag gag gaa aaa gtt gta att gat tac tct tcc gac cca 4457  
 Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser Asp Pro  
 1400 1405 1410

ttg ata act gat ggt aac ttc cgc cag aca atc ctg tcc aac att gct 4505  
 Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn Ile Ala  
 1415 1420 1425 1430

cgt gct gga cat gct atc gag gag cta tat ggc tct cct caa gac atc 4553  
 Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Ile  
 1435 1440 1445

gag ggt gta gtg agg gat gga aag att tat gtc gtt cag aca aga cct 4601  
 Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro  
 1450 1455 1460

cag atg tgatcatatt ctggttgtat gttgttcaga gaagaccata gatgtgatca 4657  
 Gln Met

tattctcatg gtatcagatc tgtgaccact tacctcccat gaagttgcct gtatgattat 4717

acgtgatcca aagccatcac atcatgttca ccttcagcta ttggaggaga agtgagaagt 4777

aggaattgca atatgaggaa taataagaaa aactttgtag aagttaaatt agctgggtat 4837

gatataggga gaaatgtgta aacattgtac tatatatagt atacacacgc attatgtatt 4897

tgcattatgc actgaataat atcgcagcat caaagaagaa atcctttgag tggtttcaat 4957

tgccgcggcc gcgaattcct gcagcccggg ggateccta gttctagagc ggccgccacc 5017

gcggtggagc tccagctttt gttcccttta gtgagggtta attt 5061

<210> 2  
 <211> 1464  
 <212> PRT  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 2

Met	Ser	Asn	Ser	Leu	Gly	Asn	Asn	Leu	Leu	Tyr	Gln	Gly	Phe	Leu	Thr
1				5					10					15	
Ser	Thr	Val	Leu	Glu	His	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Pro	Pro	Cys	Val	Gly
			20					25					30		
Gly	Asn	Ser	Leu	Phe	Gln	Gln	Gln	Val	Ile	Ser	Lys	Ser	Pro	Leu	Ser
		35					40					45			
Thr	Glu	Phe	Arg	Gly	Asn	Arg	Leu	Lys	Val	Gln	Lys	Lys	Lys	Ile	Pro
	50					55					60				
Met	Gly	Lys	Asn	Arg	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Ala	Val	Leu	Thr
	65				70					75					80
Thr	Asp	Thr	Ser	Ser	Glu	Leu	Ala	Glu	Lys	Phe	Ser	Leu	Glu	Gly	Asn
				85					90					95	
Ile	Glu	Leu	Gln	Val	Asp	Val	Arg	Pro	Pro	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Ser
			100					105					110		
Phe	Val	Asp	Phe	Gln	Ala	Thr	Asn	Gly	Ser	Asp	Lys	Leu	Phe	Leu	His
		115					120					125			
Trp	Gly	Ala	Val	Lys	Phe	Gly	Lys	Glu	Thr	Trp	Ser	Leu	Pro	Asn	Asp
	130					135					140				
Arg	Pro	Asp	Gly	Thr	Lys	Val	Tyr	Lys	Asn	Lys	Ala	Leu	Arg	Thr	Pro
	145				150					155					160
Phe	Val	Lys	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Ile	Leu	Arg	Leu	Glu	Ile	Arg	Asp
				165				170						175	
Thr	Ala	Ile	Glu	Ala	Ile	Glu	Phe	Leu	Ile	Tyr	Asp	Glu	Ala	Tyr	Asp
			180					185					190		
Lys	Trp	Ile	Lys	Asn	Asn	Gly	Gly	Asn	Phe	Arg	Val	Lys	Leu	Ser	Arg
		195					200					205			
Lys	Glu	Ile	Arg	Gly	Pro	Asp	Val	Ser	Val	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Gln
	210					215					220				
Ile	Gln	Ser	Tyr	Leu	Arg	Trp	Glu	Arg	Lys	Gly	Lys	Gln	Asn	Tyr	Thr
	225				230					235					240
Pro	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Glu	Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Gln
				245					250					255	
Glu	Glu	Ile	Ala	Arg	Gly	Ala	Ser	Ile	Gln	Asp	Ile	Arg	Ala	Arg	Leu
			260					265					270		
Thr	Lys	Thr	Asn	Asp	Lys	Ser	Gln	Ser	Lys	Glu	Glu	Pro	Leu	His	Val
		275					280						285		

Thr Lys Ser Glu Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile  
 290 295 300  
 Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Leu Glu Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys  
 325 330 335  
 Gly Ile Thr Leu Asp Glu Leu Arg Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile  
 340 345 350  
 Lys Thr Lys Ala Glu Lys His Val Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu  
 355 360 365  
 Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Phe Gly Gln Leu Ile Asn Lys Tyr  
 370 375 380  
 Pro Ser Ser Pro Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Ala Leu Ser Lys Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile  
 405 410 415  
 Asp Asp Pro Ile Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu  
 420 425 430  
 Leu Leu Val Leu Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Ile  
 435 440 445  
 Ala Thr Asp Leu Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys  
 450 455 460  
 Ser Arg Gly Glu Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Ser Ile Ile Leu Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser  
 485 490 495  
 Ser Asp Gly Leu Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu  
 500 505 510  
 Asp Gly Asn Phe Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys  
 515 520 525  
 Trp Ile Lys Asn Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ser Ala Ala  
 530 535 540  
 Ser Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys  
 545 550 555 560  
 Ser Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser  
 565 570 575  
 Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr  
 580 585 590  
 Ser Ala Gly Glu Leu Gly Phe Thr Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe  
 595 600 605

Met	Ala	Thr	Arg	Gln	Leu	Ile	Trp	Asn	Lys	Asn	Tyr	Asn	Val	Lys	Pro	610	615	620
Arg	Glu	Ile	Ser	Lys	Ala	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Gln	Asn	625	630	635
Ala	Phe	Thr	Ser	His	Pro	Gln	Tyr	Arg	Glu	Ile	Leu	Arg	Met	Ile	Met	645	650	655
Ser	Thr	Val	Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Arg	Ile	Arg	660	665	670
Asp	Glu	Ile	Leu	Val	Ile	Gln	Arg	Lys	Asn	Asp	Cys	Lys	Gly	Gly	Met	675	680	685
Met	Glu	Glu	Trp	His	Gln	Lys	Leu	His	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Asp	690	695	700
Val	Val	Ile	Cys	Gln	Ala	Leu	Ile	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp	705	710	715
Leu	Gly	Val	Tyr	Trp	Lys	Thr	Leu	Asn	Glu	Asn	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu	725	730	735
Arg	Leu	Leu	Ser	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	His	Ser	Glu	Pro	Asn	Phe	Arg	740	745	750
Gly	Asp	Gln	Lys	Asn	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Gly	His	Tyr	Met	Arg	755	760	765
Thr	Leu	Lys	Ala	Val	His	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	Ala	770	775	780
Asn	Cys	Met	Gly	Tyr	Lys	Thr	Glu	Gly	Glu	Gly	Phe	Met	Val	Gly	Val	785	790	795
Gln	Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Gly	Leu	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Gly	Leu	Leu	805	810	815
His	Phe	Val	Leu	Asp	His	Val	Glu	Asp	Lys	Asn	Val	Glu	Thr	Leu	Leu	820	825	830
Glu	Gly	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Lys	835	840	845
Pro	Asn	Asn	Arg	Leu	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Leu	Asp	Ile	Ala	Leu	Asp	850	855	860
Ser	Thr	Val	Arg	Thr	Ala	Val	Glu	Arg	Gly	Tyr	Glu	Glu	Leu	Asn	Asn	865	870	875
Ala	Asn	Pro	Glu	Lys	Ile	Met	Tyr	Phe	Ile	Ser	Leu	Val	Leu	Glu	Asn	885	890	895
Leu	Ala	Leu	Ser	Val	Asp	Asp	Asn	Glu	Asp	Leu	Val	Tyr	Cys	Leu	Lys	900	905	910
Gly	Trp	Asn	Gln	Ala	Leu	Ser	Met	Ser	Asn	Gly	Gly	Asp	Asn	His	Trp	915	920	925

Ala Leu Phe Ala Lys Ala Val Leu Asp Arg Ile Arg Leu Ala Leu Ala  
 930 935 940  
 Ser Lys Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr  
 945 950 955 960  
 Leu Gly Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr  
 965 970 975  
 Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu  
 980 985 990  
 Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp  
 995 1000 1005  
 Gln Ile Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp  
 1010 1015 1020  
 Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Lys Lys Pro Thr Ile Leu  
 1025 1030 1035 1040  
 Val Ala Asn Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val  
 1045 1050 1055  
 Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val  
 1060 1065 1070  
 Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn  
 1075 1080 1085  
 Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys  
 1090 1095 1100  
 Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu  
 1105 1110 1115 1120  
 Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg  
 1125 1130 1135  
 Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu  
 1140 1145 1150  
 Phe Thr Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu  
 1155 1160 1165  
 Lys Gly Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu  
 1170 1175 1180  
 Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly  
 1185 1190 1195 1200  
 Val Ala Lys Glu Leu Gln Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp  
 1205 1210 1215  
 Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Ile Leu Asp Leu Ser Ala  
 1220 1225 1230  
 Pro Ala Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly  
 1235 1240 1245

## 12

Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp  
 1250 1255 1260

Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr  
 1265 1270 1275 1280

Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala  
 1285 1290 1295

Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His  
 1300 1305 1310

Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val  
 1315 1320 1325

Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala  
 1330 1335 1340

Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu  
 1345 1350 1355 1360

Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile  
 1365 1370 1375

Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala  
 1380 1385 1390

Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile  
 1395 1400 1405

Asp Tyr Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr  
 1410 1415 1420

Ile Leu Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr  
 1425 1430 1435 1440

Gly Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr  
 1445 1450 1455

Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met  
 1460

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 3

Asp Lys Ala Ala Glu Thr

1

5

<210> 4  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 4  
Ile Ala Asp Met Glu  
1 5

<210> 5  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 5  
Val Trp Met Arg Phe Met  
1 5

<210> 6  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 6  
Met Gln Glu Trp His Gln  
1 5

<210> 7  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 7  
Leu Gly His Tyr Met  
1 5



<210> 8  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 8  
Glu Arg Gly Tyr Glu Glu  
1 5

<210> 9  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 9  
Lys Ala Val Leu Asp Arg  
1 5

<210> 10  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 10  
Leu Ser Ser Leu Leu  
1 5

<210> 11  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 11  
Ile Pro Asp Gly Ala Val  
1 5

<210> 12  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 12  
Lys Val Cys Phe Ala Thr  
1 5

<210> 13  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 13  
Ile Ser Ala Asp Glu Phe  
1 5

<210> 14  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 14  
Pro Phe Gly Val Phe Glu  
1 5

<210> 15  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 15  
Ser Ser Gly Asp Asp  
1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

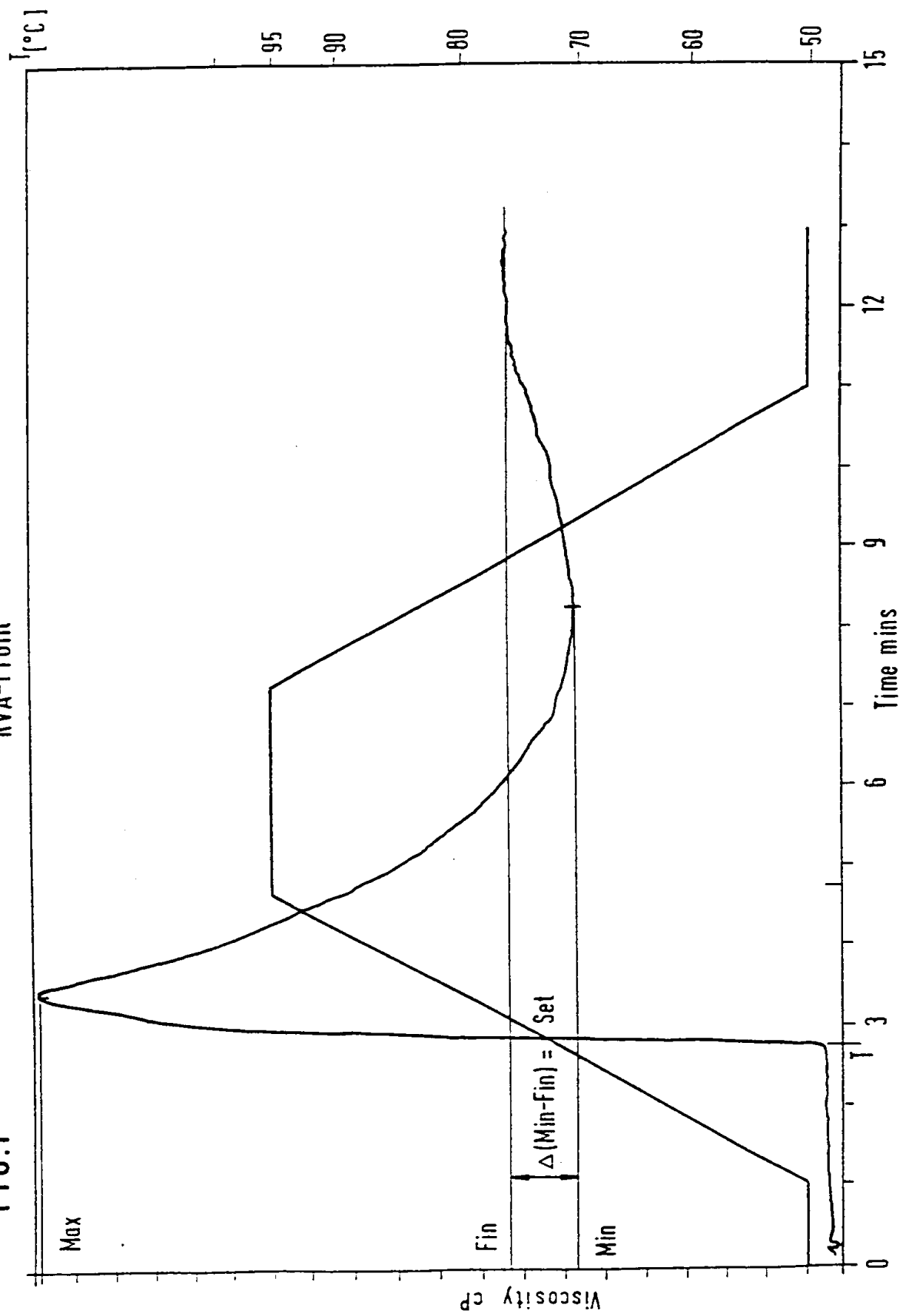
<223> Description of Artificial Sequence: Teilsequenz

<400> 16

Ser Phe Ile Cys Lys Lys  
1 5

FIG.1

RVA-Profil



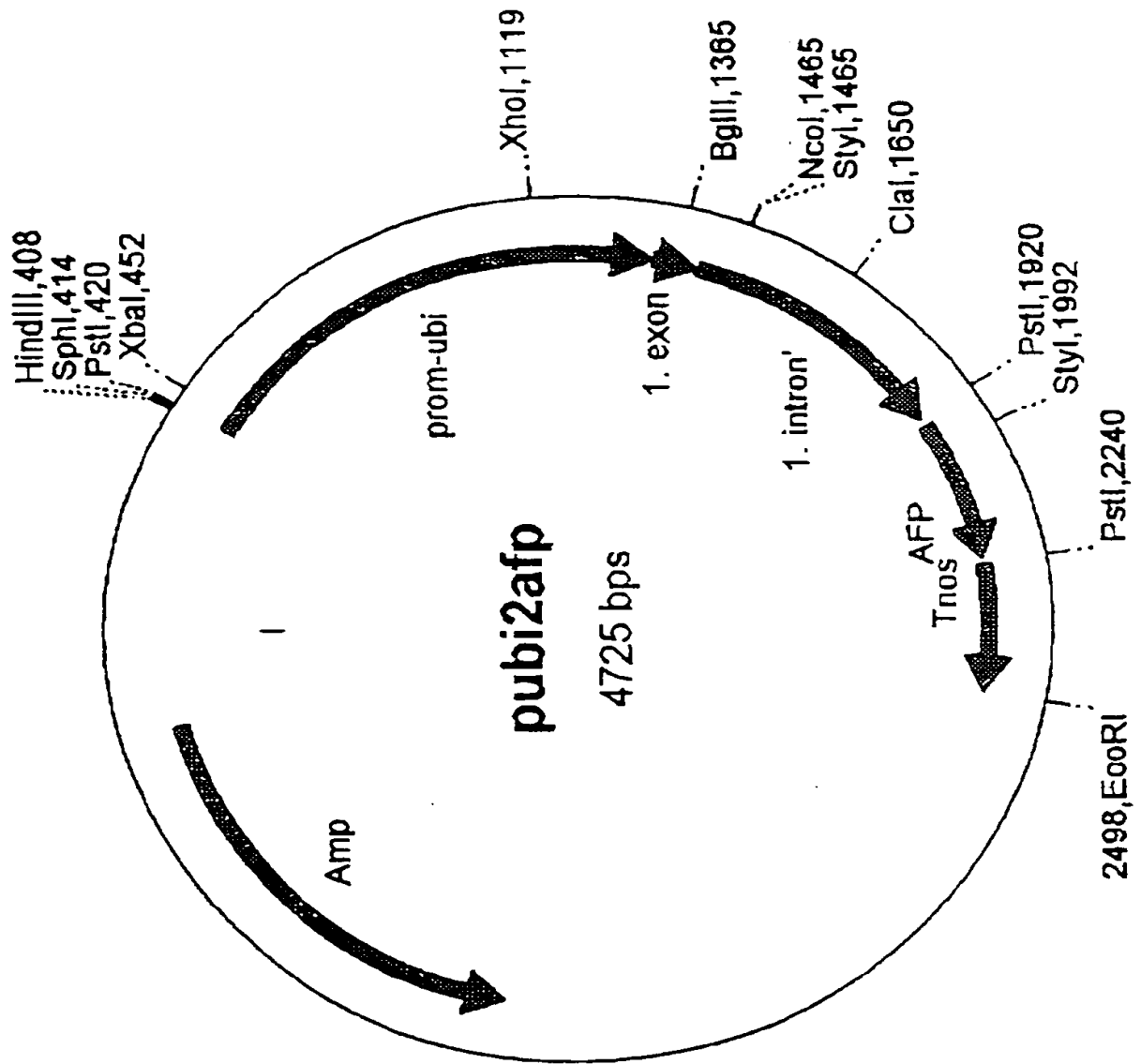


FIG.2

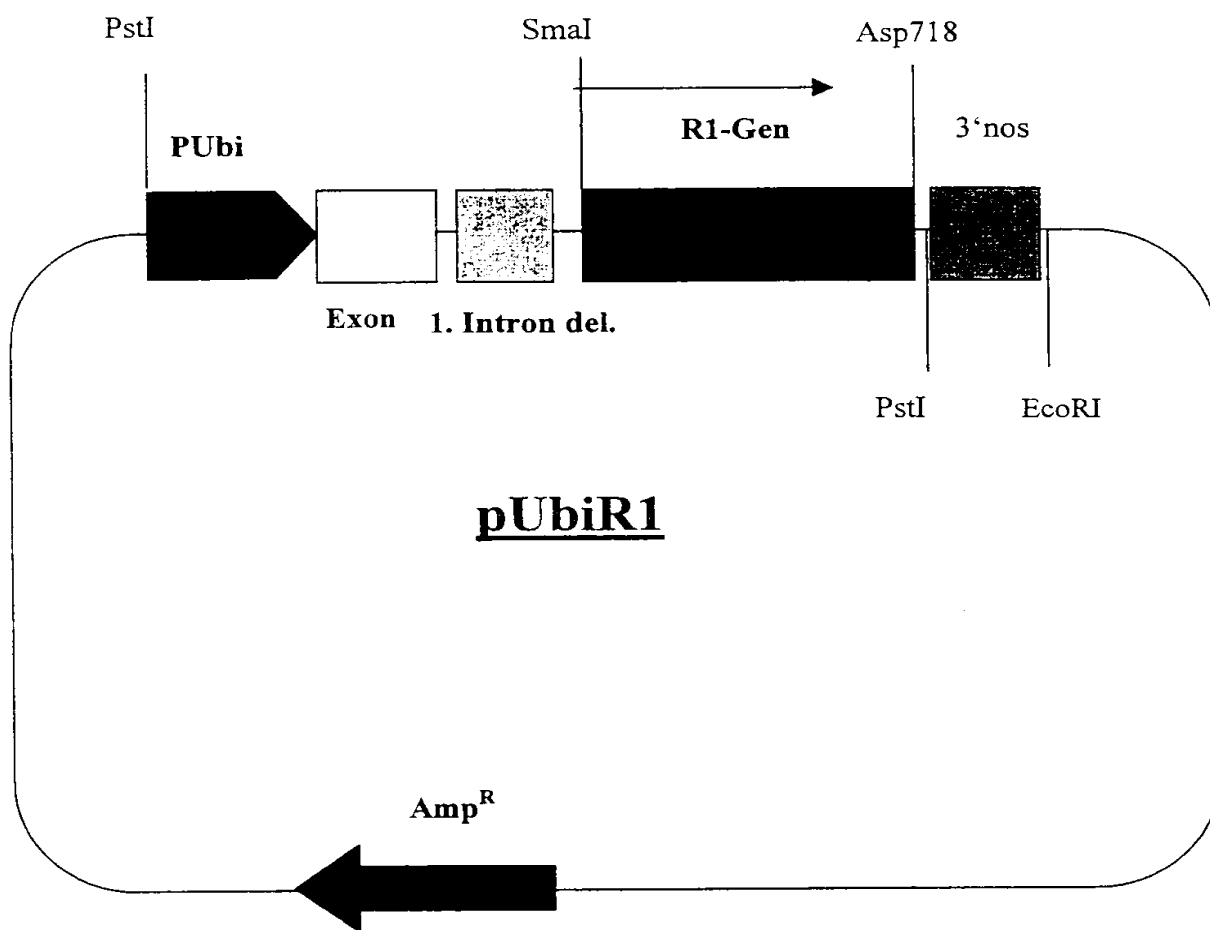


Fig. 3

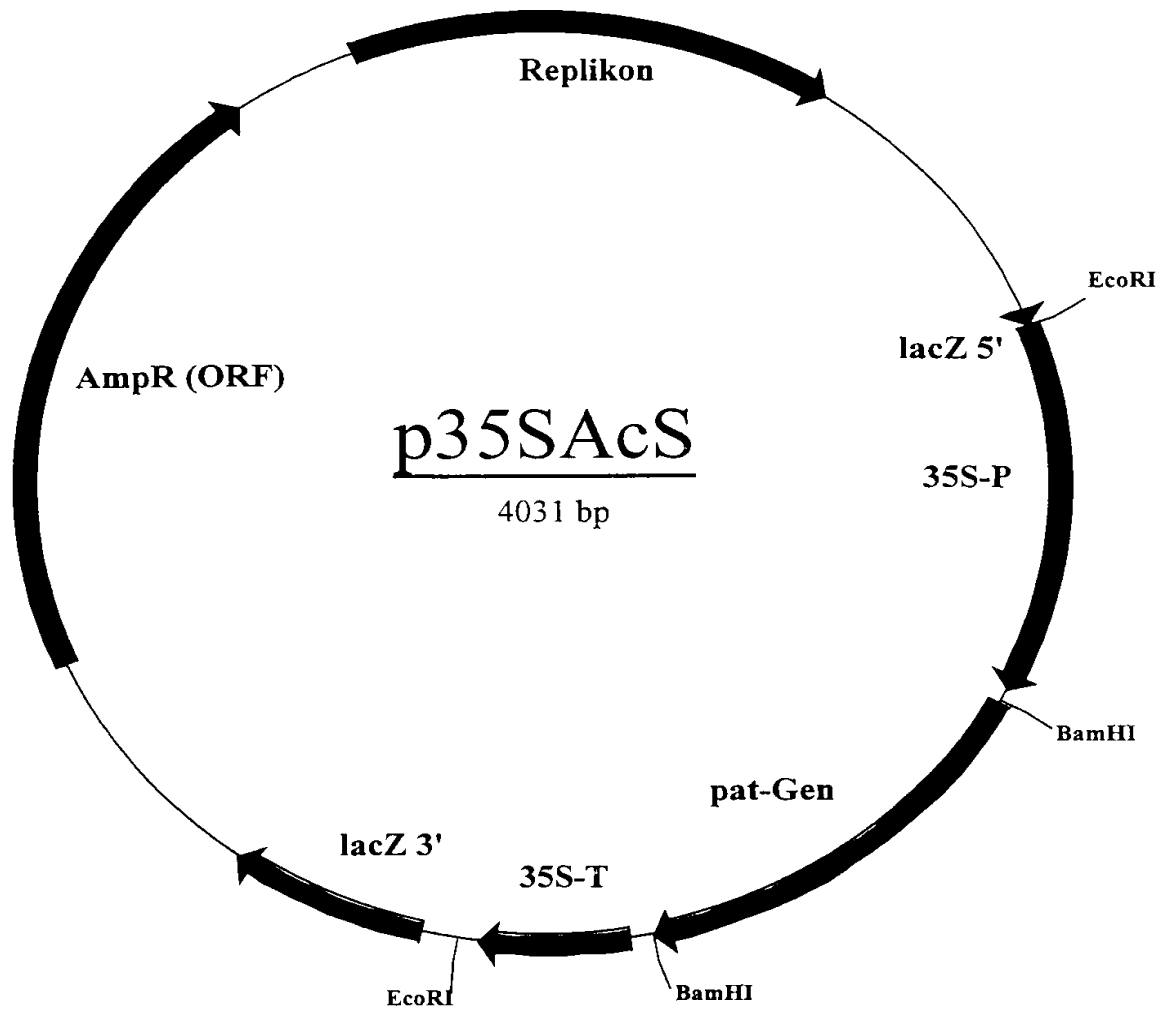


Fig. 4

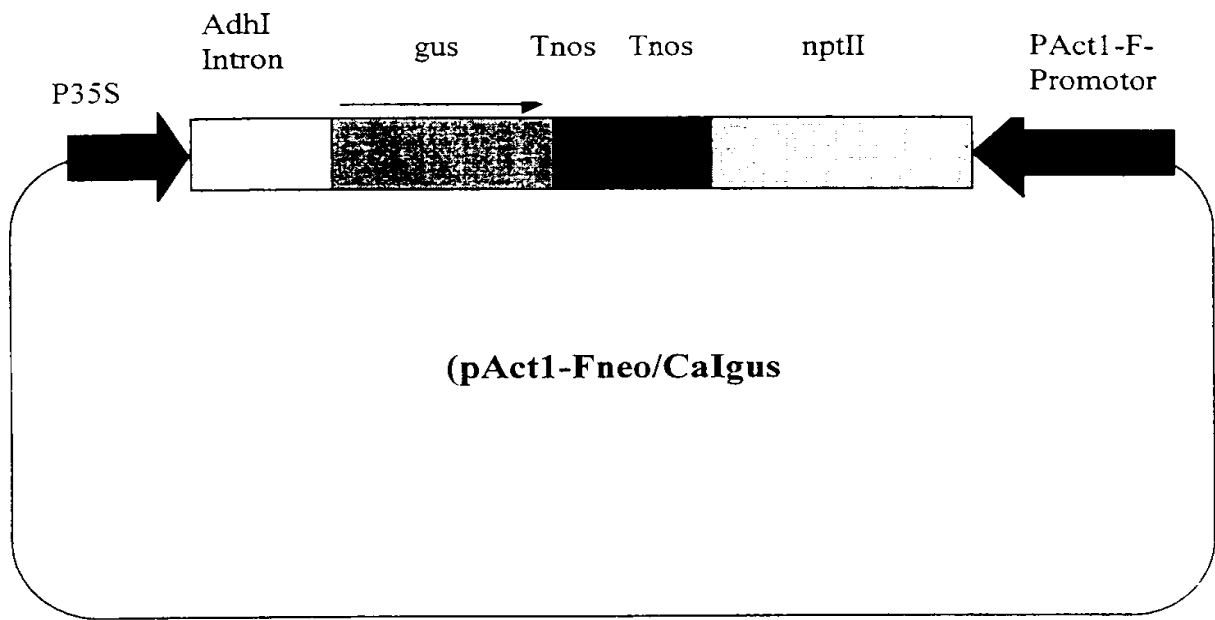


Fig. 5